



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

COMUNICAÇÃO RADICULAR INDUZIDA POR DIFERENTES TIPOS DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

DANILO MIRALHA FRANCO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

BOTUCATU - SP

2017



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**COMUNICAÇÃO RADICULAR INDUZIDA POR
DIFERENTES TIPOS DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS**

DANILO MIRALHA FRANCO

**PROF. DR. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA
ORIENTADOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

BOTUCATU - SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Franco, Danilo Miralha.

Comunicação radicular induzida por diferentes tipos de substâncias químicas / Danilo Miralha Franco. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Fernando Rolim de Almeida

Capes: 20303009

1. Plantas - Fisiologia. 2. Estresse fisiológico. 3. Expressão gênica. 4. Fisiologia vegetal.

Palavras-chave: Crescimento; Estresse; Expressão gênica; Modificação de respostas; Sinalização de raiz.

Dedico a minha família

Agradecimentos

À CAPES pela bolsa de pesquisa concedida.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida, pela orientação e amizade. Obrigado pela confiança depositada ao longo desse período de mestrado e doutorado e por todos os ensinamentos passados.

A Prof. Dr. Rodrigo de Souza Poletto, primeiro orientador e amigo, pelos diversos incentivos ao longo dessa jornada. Que a nossa parceria na pesquisa nunca acabe.

Ao Departamento de Botânica: docentes e técnico-administrativos que contribuíram para o crescimento profissional e para a realização deste trabalho. Um agradecimento especial a Maria Helena, José Eduardo e Kleber, sempre disponíveis e prestativos a qualquer momento.

Aos companheiros de laboratório Angélica Lino Rodrigues, Angelo da Silva Bertholdi, Luís Paulo Benetti Mantoan, Thayssa Schley, Roberto Portella, Thais Arruda Joca e Gabriela Vasconcellos pelo companheirismo e auxiliarem em etapas cruciais da pesquisa. Aos alunos de Iniciação Científica Lediane Coffaci, Felipe Yamashita, Gustavo Henrique Camargo.

Aos companheiros de Botucatu e Toca do Lobo, os prof. Luiz Gustavo e Danillo Pinhal, o amigo Bruno Castilho, Lucas, Marcos e Pinda por ajudarem com momentos de descontração, pois a saúde mental é sempre necessária para a melhor execução das etapas necessárias.

Aos amigos pós-graduandos e ex pós-graduandos do departamento de botânica, em especial Sérgio Adashi, Jennifer Bufalo, Felipe Giroto, Juliana Iassia, Luiz Leonardo Saldanha, Yve Canaveze, Luiz Ricardo Tozin pela disponibilidade em compartilhar as experiências.

Ao pessoal do IBTEC, em especial ao Prof. Dr. João Pessoa de Araújo Jr, pela disponibilização de laboratório.

Ao Prof. Dr. Fábio Nogueira e Dr. Eder Marques Silva, por todos ensinamentos sobre biologia molecular.

Aos amigos de fora de Botucatu, Igor, Tatiane, Fabio e Debora.

A todos os outros amigos de UNESP.

Aos meus pais Neide e Aparecido, as minhas irmãs Amanda e Michele, aos cunhados Ronaldo e Douglas e ao meu sobrinho Guilherme.

A minha namorada Camila sempre disposta aos debates sobre as demandas da área acadêmica.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para este trabalho. Obrigado!

*“How many roads must a man walk down,
Before you can call him a man?
How many seas must a white dove sail,
Before she sleeps in the sand?
Yes, and how many times must cannonballs fly,
Before they're forever banned?
The answer, my friend, is blowin' in the wind
The answer is blowin' in the wind*

*Yes, and how many years can a mountain exist,
Before it's washed to the seas (sea)
Yes, and how many years can some people exist,
Before they're allowed to be free?
Yes, and how many times can a man turn his head,
And pretend that he just doesn't see?
The answer, my friend, is blowin' in the wind
The answer is blowin' in the wind.*

*Yes, and how many times must a man look up,
Before he can see the sky?
Yes, and how many ears must one man have,
Before he can hear people cry?
Yes, and how many deaths will it take till he knows
That too many people have died?
The answer, my friend, is blowin' in the wind
The answer is blowin' in the wind”*

Blowin' in the wind – Bob Dylan

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIACÕES	12
RESUMO E ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	21
3. HIPÓTESE	22
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
4.1. <i>Comunicação vegetal</i>	23
4.2. <i>Alterações abióticas suas implicações</i>	25
4.3. <i>Marcadores moleculares</i>	29
5. MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1. <i>Aplicação dos tratamentos para estímulo de respostas em raízes</i>	35
5.2. <i>Comprimento de raízes e parte aérea</i>	36
5.3. <i>Condutância estomática</i>	37
5.4. <i>Fluorescência da clorofila a</i>	37
5.5. <i>Conteúdo relativo de água</i>	38
5.6. <i>Trocas gasosas</i>	38
5.7. <i>Determinação da atividade de enzimas antioxidantes</i>	39
5.7.1 <i>Determinação de proteínas totais</i>	39
5.7.2 <i>Catalase (CAT, EC. 1.11.1.6)</i>	40
5.7.3 <i>Peroxidase (POD, EC. 1.11.1.7)</i>	40
5.7.4 <i>Superoxido dismutase (SOD, EC. 1.15.1.1)</i>	41
5.7.5 <i>Extravasamento de eletrólitos e análise da clorofila a</i>	41
5.8. <i>Análises da expressão de genes do desenvolvimento de raiz</i>	42
5.8.1 <i>Isolamento, quantificação do RNA total e síntese de cDNA RT-PCR</i>	42
5.8.2 <i>Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR</i>	43
5.9. <i>Obtenção dos dados e análise estatística</i>	44
7. RESULTADOS.....	45
7.1. <i>Efeitos no crescimento vegetal</i>	45
7.2. <i>Trocas gasosas e relações hídricas</i>	48
7.3. <i>Fluorescência da clorofila a</i>	52
7.4. <i>Atividade de enzimas antioxidantes</i>	54
7.5. <i>Expressão de genes relacionados ao desenvolvimento radicular</i>	55

8. DISCUSSÃO	58
8.1 <i>A deficiência hídrica e a comunicação radicular</i>	58
8.2 <i>Ação herbicida induz a sinalização e comunicação</i>	59
8.3 <i>Efeito da alelopatia na comunicação de raízes</i>	60
8.4 <i>Ácido indol-3-butírico (IBA) e suas implicações comunicação radicular</i>	62
8.5 <i>Implicações dos diferentes mecanismos indutores na comunicação entre raízes</i>	63
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
10. REFERÊNCIAS	70
11. MATERIAL SUPLEMENTAR	81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo experimental para o estudo de comunicação entre raízes. Adaptado de Toledo (2015).....33
- Figura 2.** Condição de crescimento de plântulas de sorgo com 25 dias após a germinação em meio hidropônico com aeração constante em solução nº2 de Hoagland e Arnon (1950) com 50% de força iônica mantida e condutividade elétrica em 1,2mS e pH em 6,2. Botucatu, São Paulo, 2016.....34
- Figura 3.** Caracterização da temperatura e umidade relativa do ar na casa de vegetação durante o experimento. Botucatu, São Paulo, Brasil.....35
- Figura 4.** Comprimento de raízes em plantas de sorgo submetidas a diferentes tratamentos. A diferença ($P < 0,05$) é representada pelo *. A ausência indica que não houve diferença significativa.....46
- Figura 5.** Comprimento da parte aérea em plantas de sorgo submetidas a diferentes tratamentos. A diferença ($P < 0,05$) é representada pelo *. A ausência indica que não houve diferença significativa.....47
- Figura 6.** Comparação da condutância estomática das plantas tratadas, plantas controle e plantas vizinhas ao longo dos dias de tratamento. **DAAT:** dias após aplicação do tratamento. As diferenças ($P < 0,05$) são representadas pelas letras: ^A que indica diferença em relação ao controle, letra ^B que indica diferença relativa a planta vizinha e letra ^C que indica diferença em relação ao controle e a planta vizinha. A ausência das letras indica que não houve diferença significativa.....49
- Figura 7.** Conteúdo relativo de água de folhas de sorgo estimado no último dia de experimento. A diferença ($P < 0,05$) é representada pelo *. A ausência indica que não houve diferença significativa.....51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Taxa de assimilação de líquida de CO₂ em plantas de sorgo, após o sétimo dia sob efeito dos diferentes tratamentos aplicados.....50
- Tabela 2** Taxa de transporte de elétrons em plantas de sorgo submetidas a diferentes tratamentos em relação ao controle.....52
- Tabela 3:** Média do rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}), dissipação fotoquímica (qP), dissipação não fotoquímica (NPQ), rendimento quântico máximo (F_v/F_M) e conteúdo de clorofila *a* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) no sétimo DAAT, em sorgo comparadas com o controle e entre as plantas tratadas e vizinhas de cada tratamento aplicado.....53
- Tabela 4.** Atividade específica de enzimas antioxidantes: catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) em folhas e raízes.....55
- Tabela 5.** Expressão relativa dos genes *SHR*, *PHB*, *PHV* e *REV* em raízes de sorgo sobre diferentes tratamentos. A expressão genica é representada pela razão (expressão relativa) dos valores absolutos de cada gene comparados com os valores de expressão no tratamento controle normalizados pelos genes do RNA ribossomal *18S* e pelo gene Fator de Iniciação em Eucarióticos 4A-1 *EIF4a* (*Eukaryotic Initiation Factor 4A-1*).....57

LISTA DE ABREVIACOES

EPSPS	5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
ABA	cido abscísico
IBA	cido indol-3-butírico
CAT	catalase
HD-ZIP III	classe III homeodomain leucine zipper
<i>g_s</i>	condutância estomática
CRA	Conteúdo Relativo de gua
DREB1A	<i>DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING 1A</i>
DFFFA	Densidade de fluxo de fótons fotossintticamente ativos
DMF	dimetilformamida
CO₂	Dióxido de carbono
<i>qP</i>	dissipação fotoquímica
NPQ	dissipação não fotoquímica
WUE	eficiência do uso da água
<i>F_v/F_M</i>	eficiência quântica máxima do PSII
EROs	espécies reativas de oxigênio
FT	Fatares de transcrição
<i>EIF-1</i>	<i>fator de alongamento em eucariotos 1</i>
<i>F_M</i>	fluorescência máxima da folha adaptada ao escuro
<i>F_O</i>	fluorescência mínima da folha adaptada ao escuro
PEP – carboxilase	fosfoenol-piruvato carboxilase
PSII	fotossistema II
GRAS	GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1–3 (RGA), SCR
<i>GAPDH</i>	<i>gliceraldedo-3-fosfato desidrogenase</i>
ROOH	hidroperxido orgnico
<i>shr</i>	mutantes do gene SHORT-ROOT
 O₂	oxignio singleto
POD	peroxidase
H₂O₂	perxido de hidrognio
<i>PHB</i>	<i>PHABULOSA</i>
<i>PHV</i>	<i>PHAVOLUTA</i>
PVPP	polivinilpolipirrolidona
QA	quinona A
RO•	radical alkoxy
OH•	radical hidroxila
HO₂•–	radical perhidroxila
ROO•	radical perxido

Φ_{PSII}	rendimento quântico efetivo do fotossistema II
<i>REV</i>	<i>REVOLUTA</i>
RuBP	Ribulose 1,5- bifosfato
RuBisCo	ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase
rRNA 18S	RNA Ribossomal 18S
<i>SCR</i>	<i>SCARECROW</i>
<i>SHR</i>	<i>SHORT- ROOT</i>
SOD	superóxido dismutase
$O_2^{\bullet-}$	superóxidos
A_{net}	taxa de assimilação líquida de CO_2
ETR	taxa de transportes de elétrons
<i>E</i>	taxa transpiratória
Tm	temperatura de fusão
Ct	Threshold Cycle

RESUMO E ABSTRACT

FRANCO, D.M. **COMUNICAÇÃO RADICULAR INDUZIDA POR DIFERENTES TIPOS DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS**. 2017. 82p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Botânica) – Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO - Devido à natureza sésil, os vegetais estão sujeitos a modificações no ambiente que podem levar a deficiência hídrica, atividade alelopática e herbicida, e necessitam de respostas específicas para responder a elas. As respostas são induzidas pelas modificações, e demandam tempo e energia para serem ativadas. A comunicação vegetal pode ter importante função de processamento de informação, sinalizando sobre um evento estressante de uma planta para outra. Essa sinalização pode otimizar a aptidão de aclimatação ao estresse ambiental. Portanto, investigamos se diferentes tipos de substâncias podem induzir comunicação radicular em plantas de *Sorghum bicolor* (sorgo). Observando como a sinalização recebida por plantas vizinhas reflete alterações nos parâmetros avaliados, como o crescimento de raiz e parte aérea, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, atividade de enzimas antioxidantes e expressão de genes do desenvolvimento de raiz. Para isso submetemos plantas de sorgo com 25 dias após semeadura aos tratamentos com manitol, glifosato, extrato de *Copaifera langsdorffii* (copaíba), ácido indol-3-butírico (IBA) e rutina por 168 horas. Apenas a planta do primeiro vaso teve contato direto com as substâncias, caracterizando-a como planta tratada e a planta sem tratamento como planta vizinha. Os resultados indicam que as plantas vizinhas ao receberem comunicação apresentam redução do desenvolvimento de raiz. Com exceção do tratamento com extrato de copaíba, todas as plantas apresentaram alteração da condutância estomática. A sinalização induzida por plantas com manitol e extrato de copaíba podem alterar a taxa de transporte de elétrons no fotossistema II. Quanto ao conteúdo relativo de água, apenas o glifosato não induziu comunicação para alteração nesse parâmetro. Os resultados da expressão dos genes de desenvolvimento de raiz, indica a divisão dos tratamentos em dois grupos, com substâncias intrínsecas (IBA e rutina) ao metabolismo vegetal que não induzem expressão diferencial dos genes e as extrínsecas (manitol, glifosato e extrato de copaíba) que alteram a expressão dos genes. A sinalização para alteração desses genes só transmitida para plantas vizinhas quando as plantas tratadas também apresentam alteração. Apenas os tratamentos com manitol e glifosato induziram a atividade da enzima peroxidase transmitindo sinalização para as plantas vizinhas que também apresentaram aumento na atividade desta enzima. Para que ocorra a comunicação radicular de uma planta com a outra é necessário que uma das plantas receba um estímulo externo, como a aplicação de substâncias de natureza e atividades distintas. Substâncias com atividade características vão induzir o vegetal a produzir respostas, que podem alterar diferentes vias no vegetal e estimular a produção de sinalizadores para a planta vizinha que não foi afetada por aquela substância. Podemos concluir que as plantas de sorgo ao serem afetadas com as diferentes substâncias aplicadas como tratamentos, transmitem sinal para as plantas vizinhas sobre as condições em que se encontram expostas no ambiente. A experiência prévia de estresse ou a memória compartilhada através da comunicação entre plantas é um importante mecanismo de adaptação ao ambiente, pois na natureza nem todos os indivíduos da população serão expostos as alterações ambientais ao mesmo tempo. Porém a inter-relação entre eles pode levar a uma rede de respostas. As plantas vizinhas ao receberem esse sinal podem antecipar respostas aumentando as chances de tolerância às alterações ambientais, o que garante a versatilidade para lidar com estresses abióticos equilibrando as respostas de defesa com o desenvolvimento.

Palavras-chave: crescimento, modificação de respostas, expressão gênica, estresse e sinalização de raiz.

FRANCO, D.M. **ROOT COMMUNICATION INDUCED BY DIFFERENT TYPES OF CHEMICAL SUBSTANCES**. 2017. 82p. Thesis (PhD in Biological Sciences - Botany) – Institute of Biosciences, UNESP – São Paulo State University, Botucatu.

ABSTRACT - Due to the sessile nature, the plants are subject to changes in the environment that can lead to water deficiency, allelopathic activity and herbicide, and require specific responses to respond to them. Responses are induced by modifications, and it takes time and energy to activate. Plant communication can have an important information processing function, signaling a stressful event from one plant to another plant nearby. This signaling can optimize acclimatization ability to environmental stress. Therefore, we investigate whether different types of substances can induce root communication in sorghum plants. Observing how the signaling received by neighboring plants reflects changes in the parameters evaluated, such as root and shoot growth, gas exchange, chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzyme activity and expression of root development genes. In order to do this, we submitted *Sorghum bicolor* (sorghum) plants 25 days after sowing the treatments with mannitol, glyphosate, *Copaifera langsdorffii* (copaíba), indole-3-butyric acid (IBA) and rutin for 168 hours. Only the plant that had direct contact with the substances, characterizing it as a treated plant and the untreated plant as a neighboring plant. The results indicate that neighboring plants receiving communication present reduced root development. With the exception of the treatment with copaiba extract, all the plants showed a change in stomatal conductance. Signaling induced by plants with mannitol and copaiba extract may alter the rate of electron transport in photosystem II. Regarding the relative water content, only glyphosate did not induce communication to alter this parameter. The results of the expression of the root development genes indicate the division of the treatments into two groups with intrinsic substances (IBA and rutin) to plant metabolism that do not induce differential expression of the genes and the extrinsic ones (mannitol, glyphosate and copaiba extract) which alter the expression of the genes. Signaling for alteration of these genes is only transmitted to neighboring plants when the treated plants also change. Only treatments with mannitol and glyphosate induced the activity of the peroxidase enzyme, transmitting signaling to neighboring plants that also showed an increase in the activity of this enzyme. For root, communication to occur from one plant to another it is necessary for one of the plants to receive an external stimulus, such as the application of substances of different nature and activities. Substances with characteristic activity will induce the vegetable to produce responses, which can alter different pathways in the plant and stimulate the production of flags for the neighboring plant that has not been affected by that substance. We can conclude that the sorghum plants, when affected with the different substances applied as treatments, transmit signals to neighboring plants about the conditions in which they are exposed in the environment. Previous stress experience or shared memory through plant-to-plant communication is an important mechanism of adaptation to the environment, since in nature not all individuals in the population will be exposed to environmental changes at the same time. However, the interrelationship between them can lead to a network of responses. Neighboring plants receiving this signal can anticipate responses by increasing the chances of tolerance to environmental changes, which ensures the versatility to deal with abiotic stresses by balancing defense responses with development.

Keywords: growth, response modification, gene expression, stress e root signaling.

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais, caracterizados por serem sésseis, estão sujeitos a adversidades ambientais que podem lhes causar dano. Assim, a capacidade de resistir aos eventos estressantes aos quais estão sujeitos durante seu ciclo de vida é fundamental para o sucesso da espécie. A comunicação vegetal pode ter importante função de processamento de informação (GROSS, 2016), pois a sinalização sobre um evento estressante de uma planta para outra planta vizinha, pode levar à ativação de mecanismos de tolerância, antes de ser exposta a condição adversa.

Porém tanto os mecanismos de defesa quanto de comunicação entre os vegetais, são mediados por compostos químicos produzidos em diferentes tecidos e órgãos e um dos mecanismos de liberação desses compostos é a exsudação radicular (NADIN, 2016; VENTURI; KEEL, 2016). Um fator importante para que ocorra comunicação radicular é a co-ocorrência espacial de raízes de plantas vizinhas, pois, apesar do distanciamento da parte aérea, o crescimento radial permite o contato com raízes de outras plantas e possibilita a comunicação química.

Alterações abióticas, como a deficiência hídrica, compostos do metabolismo secundário (alelopatia), compostos herbicidas aplicados em cultivares agrícolas, podem alterar a homeostase aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e causar estresse, acarretando na baixa produtividade e degradação das reservas, levando o vegetal a morte (DAT et al., 2000; GASPAR et al., 2002; CRISP et al., 2016). Na natureza a deficiência hídrica pode ocorrer pela baixa disponibilidade de água ou por alterações no potencial osmótico do solo, provocado por altas concentrações salinas ou por substâncias osmoticamente ativas como o manitol, levando a redução do potencial hídrico, diminuindo a eficiência de absorção de água pelas raízes (GIMENEZ; GALLARDO; THOMPSON, 2005). Os processos fisiológicos em plantas são dependentes do nível de hidratação das células e tecidos. Na fotossíntese, a absorção das moléculas de carbono é possibilitada através da

pressão de turgor nas células guardas, abrindo os ostíolos estomáticos, permitindo a perda de água pela transpiração e a entrada do CO₂ (CHAVES et al., 2002).

A produção e liberação de compostos do metabolismo secundário ou especializado em plantas (aleloquímicos) podem causar o fenômeno da alelopatia (INDERJIT; CALLAWAY; VIVANCO, 2006; BELZ, 2007), mecanismo de interação química pelo qual uma planta inibe ou promove o desenvolvimento de outra planta para o próprio benefício, na competição por luz, água e nutrientes (RICE, 1984; BAIS et al., 2003; BELZ, 2007). Dentre os aleloquímicos mais estudados temos o grupo dos flavonoides, compostos polifenólicos mais comuns em plantas (OTEIZA et al., 2005; BUER; IMIN; DJORDJEVIC, 2010). Na natureza, os flavonoides são encontrados sob a forma de glicosídeos, porém podem apresentar formas glicosiladas devido a transformações fotoquímicas (WILHELM FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001; SISA et al., 2010). A atividade biológica desempenhada pelos flavonoides com maior destaque é a antioxidante, que pode ser demonstrada através da limitação da produção de EROs e/ou eliminação delas e está associada a substituição da hidroxila do anel B (RICE – EVANS; PACKER, 1998; BAIS et al., 2003; TAYLOR; GROTEWOLD, 2005; PEER; MURPHY, 2007; AGATI et al., 2012). Também apresentam propriedades estimulantes para a comunicação entre membranas, regulação do crescimento celular, indução de enzimas de detoxificação, inibição da germinação e crescimento de plântulas (MACÍAS et al., 1997; HOAGLAND; WILLIAMS, 2004; FRANCO et al., 2015b, 2016). Muitos autores relatam que o padrão de substituição do anel B dos flavonoides é provavelmente responsável pela atividade alelopática e a associação estrutura-atividade está relacionada à fitotoxicidade destes compostos (BAIS et al., 2003; ALMEIDA et al., 2008; DE MARTINO et al., 2012).

Dentre as substâncias com atividade herbicida, o glifosato é uma comumente usada na agricultura, e atua principalmente na via do ácido chiquímico inibindo a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), que catalisa a condensação do ácido chiquímico e do

fosfoenolpiruvato, afetando a síntese de aminoácidos essenciais e compostos fenólicos (STEINRÜCKEN; AMRHEIN, 1980; PIOTROWICZ-CIESLAK; ADOMAS; MICHALCZYK, 2010; MAEDA; DUDAREVA, 2012). É também acumulado em regiões meristemáticas afetando diretamente o desenvolvimento vegetal (DUKE, 2016).

De modo geral, moléculas com potencial estressante podem alterar a produção e o acúmulo de EROs, geralmente acompanhada da ativação de sistemas celulares de defesa, como a produção de enzimas antioxidantes (BAIS et al., 2003; GNIAZDOWSKA; BOGATEK, 2005). A alteração metabólica resultante da produção de EROs, leva a inibição do desenvolvimento do vegetal, pois a demanda energética para produção de moléculas de defesa é alta e assim, a inibição do crescimento de raiz é um dos primeiros parâmetros de desenvolvimento afetado (FERREIRA; AQUILA, 2000; PRATES et al., 2000).

A via regulatória do desenvolvimento radicular é dependente da atividade de genes que induzem a sinalização bioquímica e fisiológica necessária para o processo. Foram identificados diferentes genes que regulam o crescimento indeterminado das raízes. Um destes genes codifica a proteína SHORT- ROOT (SHR), um fator de transcrição da família GRAS [GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1–3 (RGA), SCR] e componente chave no caminho de desenvolvimento que regulam a especificação do grupo de células meristemáticas da raiz, bem como a padronização radial em *Arabidopsis* (BENFEY et al., 1993; NAKAJIMA et al., 2001). Fatores de transcrição da classe III homeodomain leucine zipper (*HD-ZIP III*) – *REVOLUTA (REV)*, *PHABULOSA (PHB)* e *PHAVOLUTA (PHV)* controlam a formação do meristema apical e lateral (OTSUGA et al., 2001; EMERY et al., 2003). A expressão destes fatores de transcrição especifica os tipos de tecidos vasculares no início do desenvolvimento nas regiões apicais (CARLSBECKER et al., 2010).

Neste contexto, a comunicação radicular se caracteriza como um importante sistema de sinalização aos diferentes tipos de alterações abióticas. Pois, as plantas vizinhas ao

receberem o sinal sobre a alteração, podem antecipar respostas, aumentando as chances de tolerar essa alteração e não sofrerão estresse. Com essa estratégia, apesar de alguns indivíduos sofrerem com a alteração mais do que outros, a população é mantida. Portanto, com a aplicação de manitol (deficiência hídrica), extrato vegetal, rutina (alelopatia), glifosato (herbicida) e ácido indol-3-butírico (regulador vegetal) poderemos observar se plantas sob efeito de alguma dessas moléculas, ao receber sinalização, comunicam-se com plantas vizinhas.

2. OBJETIVOS

- Investigar se diferentes tipos de substâncias podem induzir comunicação radicular em plantas de sorgo.

- Testar se a sinalização recebida por plantas vizinhas leva a alterações nos parâmetros avaliados – comprimento de raiz e parte aérea, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, atividade de enzimas antioxidantes e expressão de genes do desenvolvimento de raiz.

3. HIPÓTESE

Nossa hipótese é de que as plantas de sorgo submetidas as diferentes substâncias aplicadas transmitem sinal para as plantas vizinhas sobre as condições a que estão expostas. As plantas vizinhas ao receberem esse sinal podem antecipar respostas e posteriormente ao serem afetadas por essas moléculas apresentarão maior tolerância.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. *Comunicação vegetal*

Os vegetais, caracterizados por serem sésseis, estão sujeitos a quaisquer adversidades que possam lhes causar danos. Assim, a capacidade de resistir aos eventos estressantes aos quais poderão estar sujeitos durante seu ciclo de vida é fundamental para o sucesso da espécie. A comunicação vegetal pode ter importante função de processamento de informação (GROSS, 2016), pois a sinalização após um evento estressante recebida de uma planta vizinha que já está sob efeito do estresse, pode levar à ativação de mecanismos de tolerância, antes de ser exposta a condição adversa. Por não apresentarem mobilidade, tanto os mecanismos de defesa quanto de comunicação entre os vegetais, são mediados por compostos químicos produzidos em diferentes tecidos e órgãos e os principais meios de liberação ocorrem através da volatilização na parte aérea e pela exsudação radicular (NADIN, 2016; VENTURI; KEEL, 2016).

A volatilização é o tipo de comunicação vegetal mais associada aos benefícios ecológicos para a dinâmica de populações vegetais. Este mecanismo é utilizado para atração de polinizadores e evitar herbivoria, pois, após reconhecer a identidade do herbívoro, algumas espécies vegetais podem emitir compostos voláteis para atrair o predador específico (ARIMURA et al., 2008). Já as raízes e a produção de biomoléculas são frequentemente relacionadas com a promoção de crescimento de micro-organismos ou inibição de parasitas na rizosfera (VENTURI; KEEL, 2016). Um fator importante para que ocorra comunicação radicular é a co-ocorrência espacial de raízes de plantas vizinhas. Apesar do distanciamento da parte aérea, o crescimento de raiz ocorre de maneira radial, permitindo o contato com raízes de outras plantas vizinhas, permitindo que a comunicação química ocorra de forma eficiente. A exsudação radicular é importante não só para a comunicação entre os vegetais,

mas também é importante para a interação entre planta e micro-organismos (WALKER et al., 2003; BAIS et al., 2006).

Em sorgo alguns exsudados de raiz já estão caracterizados, sendo sorgoleone o principal e mais bem descrito, porém, outros compostos derivados como, 5-ethoxysorgoleone e 2,5-dimethoxysorgoleone também são descritos (CZARNOTA; RIMANDO; WESTON, 2003). Foram relatados efeitos inibidores da fotossíntese em *Glycine max* (EINHELLIG et al., 1993), caracterizando sorgoleone como potencial agente fitotóxico para outras plantas (DUKE et al., 2001). Porém, devido a mecanismos evolutivos, muitas espécies não apresentam auto-alelopatia, assim, esses exsudatos de raiz podem ser caracterizados como moléculas sinalizadoras para plantas vizinhas. Deste modo, moléculas consideradas aleloquímicas inibidoras para outras espécies podem ser utilizadas como sinalizadoras para outros indivíduos da mesma espécie, espécies coexistentes ao longo do processo evolutivo e para os micro-organismos da rizosfera (VAN DAM; BOUWMEESTER, 2016).

Os hormônios vegetais são substâncias que aparecem envolvidas em diversas funções fisiológicas, incluindo redes de transdução de sinais (DEPUYDT; HARDTKE, 2011). Dentro do grupo de hormônios vegetais encontramos as auxinas, associadas, ao crescimento e desenvolvimento vegetal (LUDWIG-MÜLLER, 2000), à dominância apical, respostas de tropismo, desenvolvimento vascular, padrão celular de tecidos e órgão, desenvolvimento de flores e frutos, incluindo a sinalização primária da família de genes responsivos à auxina, *Aux/IAA*, *GH3* e *SAUR* (HAGEN; GUILFOYLE, 2002; GHANASHYAM; JAIN, 2009). Essa sinalização inicial para genes responsivos está envolvida nas vias de sinalização de respostas a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos (CHEONG et al., 2002; GHANASHYAM; JAIN, 2009).

4.2. Alterações abióticas suas implicações

As plantas, estejam elas ocupando seu ambiente natural ou sendo cultivadas, estão sujeitas a alterações bióticas e abióticas no espaço em que ocupam. Essas alterações podem ser benéficas ou prejudiciais e podem ocasionar alterações fisiológicas, anatômicas e morfológicas no vegetal. Quando ocorre alteração no ambiente, principalmente quando essa alteração é prejudicial, elas podem induzir sinalização para o vegetal, indicando a característica e a possibilidade de estresse. Dentre os diferentes tipos de alterações caracteriza-se a deficiência hídrica, acúmulo de compostos alelopáticos, acúmulo de substâncias herbicidas e a sinalização por hormônios vegetais.

A deficiência hídrica pode ocorrer por períodos de seca e também por alterações osmóticas no solo, muitas vezes ocasionadas pela alta concentração de sais e outras substâncias osmoticamente ativas (DODD; DONOVAN, 1999). O manitol é um composto geralmente utilizado como para simular deficiência hídrica, pois apresenta característica inerte e não tóxica (ÁVILA et al., 2007) e dentre as respostas ocasionada pela sua aplicação observamos a redução do crescimento, levando a baixa estatura e baixa fertilidade e quando o vegetal não apresenta tolerância o rendimento energético também é reduzido (NASER; SHANI, 2016; SILVESTRE et al., 2017). Isso ocorre, pois processos fisiológicos em plantas são dependentes do nível de hidratação das células e tecidos. Na fotossíntese, por exemplo, a absorção das moléculas de carbono é possibilitada através da pressão de turgor nas células guardas, abrindo os ostíolos estomáticos permitindo a perda de água pela transpiração e possibilitando a entrada de CO₂ (CHAVES et al., 2002). Portanto, os mecanismos de ajuste para o equilíbrio da absorção, transporte e perda de água pelos vegetais é um fator determinante para o estabelecimento dos diferentes grupos de plantas que compõe formações vegetais sujeitas a diferentes condições de disponibilidade hídrica (NATHAN et al., 2016).

Quando a água passa a ser um recurso limitante, as espécies que se estabeleceram no ambiente ao longo de seus períodos evolutivos, podem apresentar diferentes mecanismos de adaptação ou aclimatação à indisponibilidade hídrica. Essas espécies podem apresentar, quando resistentes, mecanismos de tolerância a períodos com baixa disponibilidade hídrica e baixa umidade, o que pode ser um fator determinante para que uma espécie ocupe uma fitofisionomia restrita ou diferentes fitofisionomias (NATHAN et al., 2016). Assim, o fluxo de água no sistema solo-planta-atmosfera pode ser alterado e os diferentes mecanismos apresentados podem indicar a tolerância, o que torna o indivíduo apto a se estabelecer em um ambiente com época seca, ou a suscetibilidade, que pode levar perda da homeostase, ocasionando estresse hídrico.

Portanto, diferentes mecanismos de ajuste podem ocorrer nos vegetais em função dos diferentes níveis de deficiência hídrica e suas correlações com as variáveis ambientais podem nos informar as diferentes respostas fisiológicas passíveis de ocorrer. Um indicador do estado hídrico nas plantas é o conteúdo relativo de água (CRA) foliar, indicador fisiológico direto sobre o grau de deficiência hídrica (NOBEL, 1983; SINCLAIR; LUDLOW, 1985). O CRA expressa a porcentagem do conteúdo de água de um tecido em relação à capacidade máxima de água que aquele tecido pode comportar, expressando o estado hídrico de uma planta (BOYER, 1969; SLAVIK, 1974). Em situações de deficiência hídrica, um mecanismo encontrado para a manutenção do CRA é a restrição da condutância estomática. Em condições de baixa disponibilidade hídrica, a manutenção de menor potencial hídrico, pode reduzir a abertura dos estômatos, caracterizando um mecanismo para evitar a perda de água, onde poderá ser observado baixa oscilação no conteúdo relativo de água (KUDOYAROVA; KHOLODOVA; VESELOV, 2013). A abertura dos estômatos é um movimento vegetal de extrema importância para a fisiologia da fotossíntese, pois permite a entrada de CO₂ utilizado

nas fases de carboxilação. Em contraponto, favorece a perda de água e, por isso, os vegetais possuem diferentes respostas para abertura e fechamento dos estômatos.

A condutância estomática representa os níveis de abertura e fechamento dos estômatos, fator atrelado ao estado hídrico da planta. Plantas com uma alta disponibilidade hídrica apresentam, geralmente, boa correlação entre o potencial hídrico da folha e condutância estomática, enquanto que a baixa disponibilidade hídrica pode levar ao fechamento parcial ou total, diminuindo a condutância (TARDIEU; SIMONNEAU, 1998). As respostas estomáticas são complexas e dependem de diferentes fatores como a qualidade da luz, concentração de CO₂, umidade do ambiente, temperatura, potencial hídrico e/ou turgor da folha além dos sinais hormonais de citocinina e ácido abscísico (KLEIN, 2014).

A combinação da avaliação de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a* é utilizada para investigar efeitos não estomáticos na limitação da fotossíntese (ENNAHLI; EARL, 2005), uma vez que alterações na dissipação de energia luminosa no aparato fotossintético interferem na atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo) na bainha do feixe vascular, e da fosfoenol-piruvato carboxilase (PEP – carboxilase) no mesófilo (plantas C4), repercutindo no rendimento quântico do fotossistema II, na inativação de enzimas do ciclo de Calvin e na redução da síntese de ATP e Ribulose 1,5- bifosfato (RuBP) afetando a eficiência da atividade fotossintética (VAZ et al., 2010). Essas alterações podem ser analisadas através das taxas de transportes de elétrons (ETR), do rendimento quântico efetivo do fotossistema II (PSII), e através das taxas de dissipação não fotoquímica e dissipação por calor, que refletem diretamente na eficiência da fotossíntese. O rendimento quântico máximo (F_V/F_M) é utilizado para detectar alterações induzidas pelo estresse no aparato fotossintético. Segundo Björkman e Demmig (1987) o valor observado na maior parte das plantas vasculares é taxado em $0,832 \pm 0,004$. O declínio nos valores da fluorescência máxima da folha adaptada ao escuro (F_M) e a redução na F_V/F_M refletem na

redução da habilidade do PSII em reduzir o acceptor primário QA (quinona A) (CALATAYUD; BARRENO, 2001); enquanto a fluorescência mínima da folha adaptada ao escuro (F_o) aumenta quando o aparato fotoquímico está danificado, indicando inibição do ciclo de reparo do PSII em especial a proteína D1 (HAKALA et al., 2005; OHNISHI et al., 2005; NISHIYAMA; ALLAKHVERDIEV; MURATA, 2006).

Os aleloquímicos podem ter ação indireta levando a mudanças nas propriedades do solo ou indução do crescimento de micro-organismos produtores de substâncias que beneficiem a planta; ou ação direta interferindo no crescimento e desenvolvimento da planta, causando alterações a nível celular, modificações no funcionamento das membranas, balanceamento de hormônios vegetais, alterações na fotossíntese e na absorção de água e nutrientes (RIZVI; RIZVI, 1992; GNIAZDOWSKA; BOGATEK, 2005; OTEIZA et al., 2005). Na fotossíntese os efeitos dessas substâncias podem ser primários quando reagem com proteínas dos complexos do fotossistema ou secundários, pois podem desencadear a produção de moléculas com capacidade oxidativa e desviar o fluxo de elétrons utilizados na cadeia de transporte de elétrons para formação de ATP e NADPH (ZHOU; YU, 2006). Os flavonoides são caracterizados como substâncias aleloquímicas, apresentam carga negativa em pH neutro e em baixas concentrações podem promover o crescimento celular aumentando a eficiência de enzimas, proteínas e carreadores de elétrons; porém, em altas concentrações podem hiperpolarizar membranas, alterando o funcionamento de bombas de ATP, sendo caracterizados como tóxicos para as células, causando a redução no crescimento (ALMEIDA et al., 2008; AGATI et al., 2012; DE MARTINO et al., 2012). De modo geral, as alterações abióticas podem alterar a produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), geralmente acompanhada da ativação de sistemas celulares de defesa, como a produção de enzimas antioxidantes (BAIS et al., 2003; GNIAZDOWSKA; BOGATEK, 2005; SUZUKI et al., 2012).

EROs são moléculas que contém oxigênio em estado reativo com alta capacidade oxidativa em função da redução do oxigênio molecular (O_2), durante processos de respiração celular, dentre as quais podemos encontrar mais comumente em plantas superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), radical perhidroxila ($HO_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}), radical alkoxy (RO^{\bullet}), radical peróxido (ROO^{\bullet}), oxigênio singlete (1O_2) e hidroperóxido orgânico ($ROOH$) (BHATTACHARJEE, 2012). O aumento da produção e acumulação de EROs causa a peroxidação lipídica, leva ao estresse oxidativo e induz o sistema redox a variadas respostas celulares. O resultado desta indução leva a alterações na sinalização bioquímica que pode alterar a produção de enzimas antioxidantes e, em situações extremas, pode levar a danos e morte celular (BHATTACHARJEE, 2005, 2012). A atividade de enzimas antioxidantes constitui um importante mecanismo de neutralização de EROs, sendo as principais enzimas relacionadas com os mecanismos de neutralização (DAVIS; SWANSON, 2001; HUNG; KAO, 2003), pois o aumento da atividade dessas enzimas está relacionado com a redução da concentração de EROs.

4.3. Marcadores moleculares

A fisiologia vegetal, atualmente conta com as ferramentas de biologia molecular como fortes aliadas para melhor compreensão de vias fisiológicas de desenvolvimento e metabolismo. Essa vertente tem ganhado mais força, após o estudo do genoma e transcriptoma de *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor* e *Oriza sativa*. Essas ferramentas podem ajudar na descoberta de aspectos fisiológicos de alterações abióticas, como a deficiência hídrica, atividade alelopática e fitotoxicidade de herbicidas. A expressão dos genes pode ser monitorada apontando as alterações causadas pelo agente estressor na expressão gênica indicando possíveis alterações na(s) via(s) bioquímica(s) atingida(s).

Com isso a quantificação da expressão dos genes se tornou a fonte mais utilizada para se obter dados da funcionalidade do genoma. Estudos sobre expressão gênica fornecem dados

importantes sobre a funcionalidade dos genes, e indicam alterações no padrão de expressão relacionadas a diferentes condições em que o organismo pode ser exposto e fornecem informações importantes sobre as interações com as vias metabólicas e fisiológicas (BRAZMA et al., 2001). Atualmente a técnica mais utilizada é o sequenciamento de RNA ou RNA-seq, que consiste em sequenciar todo material de RNA (e.g. RNA mensageiro e micro-RNA), obtendo o transcriptoma total do vegetal, que pode ser comparado com diferente o mesmo vegetal em diferentes situações (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Isso permite observar variações nos níveis de expressão dos genes e fornece genes alvos para estudos em fisiologia vegetal. Esses genes alvos podem então ser utilizados para estudos focando as vias específicas, sem que seja preciso sequenciar todo transcriptoma.

O crescimento de raiz é mais afetado por diferentes tipos de alterações abióticas, incluindo a deficiência hídrica, ação herbicida e alelopatia, uma vez, que as raízes estarão envolvidas diretamente com as substâncias aplicadas – efeito herbicida e alelopático – ou com a falta de água (FERREIRA; AQUILA, 2000; PRATES et al., 2000). A raiz apresenta a importante função de sustentação das plantas terrestres e permite à obtenção de água e nutrientes do ambiente, importante adaptação para este modo de vida. Os tecidos que compõe este órgão e os tipos celulares surgem do meristema apical (DI LAURENZIO et al., 1996; SCHIEFELBEIN; MASUCCI; WANG, 1997; CARLSBECKER et al., 2010). O padrão radial é uma das características básicas em órgãos vegetais, incluindo a raiz, é constituído por camadas concêntricas de tecidos de três tipos fundamentais: a epiderme, a região do córtex e o tecido vascular. Ao longo do eixo apical-basal da raiz três regiões se distinguem: a zona meristemática, zona de alongamento e a zona maturação (YAMAUCHI; PARDALES JR; KONO, 1994; SCHERES et al., 1995).

Diferentes genes são associados a regulação do crescimento indeterminado de raízes. Um desses genes, o *SHORT- ROOT (SHR)* a proteína SHR, um fator de transcrição da família

GRAS [*GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI)*, *REPRESSOR OF GAI-3 (RGA)*, *SCR*] e compõe a rota de desenvolvimento que regula a especificação de células em meristemas radiculares e a padronização radial em *Arabidopsis thaliana* (BENFEY et al., 1993; NAKAJIMA et al., 2001; CARLSBECKER et al., 2010). As plantas mutantes *shr* que não apresentam expressão deste gene, possuem raízes primárias extremamente reduzidas (BENFEY et al., 1993; SCHERES et al., 1995; YU et al., 2010). As mutações nos genes da família *SHORT ROOT (SHR)* e *SCARECROW (SCR)* induzem a formação de uma camada única de tecido fundamental no córtex radicular. O gene *SHR* é importante na diferenciação de células de endoderme, pois a ausência da expressão deste gene leva a formação de tecido fundamental com células corticais e ausência de endoderme (SCHERES et al., 1995).

Os membros da família *HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER III (HD-ZIP III)*, são fatores de transcrição (FT) compostos pelos genes *REVOLUTA (REV)*, *PHABULOSA (PHB)* e *PHAVOLUTA (PHV)* e associados a diferenciação de células do meristema apical e lateral (OTSUGA et al., 2001; EMERY et al., 2003). Podem ser expressos em padrões complementares a família gênica *KANADI*, induzindo a capacidade de diferenciação do periciclo para formação de raízes laterais (HAWKER; BOWMAN, 2004). A expressão destes FT é requerida para diferenciação das células de xilema, onde altos níveis levam a formação de metaxilema e baixos níveis, a formação de protoxilema. Os membros dessa família gênica sofrem regulação pós-transcricional via RNAs regulatórios, os microRNAs 165 e 166 (JUAREZ et al., 2004). Carlsbecker et al. (2010) observaram que miRNAs podem ser transportados pelas células radiculares e reprimem os transcritos de *HD-ZIP III* ligando-se em complemento a fita simples do mRNA. A regulação espacial dos transcritos dos genes *HD-ZIP III* é um fator-chave para o desenvolvimento da lâmina foliar em milho (NOGUEIRA et al., 2007) e para padronização radial da raiz (CARLSBECKER et al., 2010). Zhong e Ye (2007) sugerem que a regulação de *HD-ZIP III* por miR165 e miR166 é mediada não só pela

expressão tecido-específica, mas também por efeitos diferenciais na clivagem dos transcritos alvos.

Para todos estes estudos de expressão gênica em condições de desenvolvimento diferenciadas a quantificação de transcritos dos genes alvos pode ser expressa em número absoluto ou relativo. A quantificação absoluta determina a quantidade exata de amplicons, através do método da curva padrão, onde se emprega quantidades conhecidas de amostra, enquanto na quantificação relativa são utilizadas equações que envolvem o valor de Ct (Threshold Cycle) da amostra, de um calibrador e de um gene normalizador.

O gene normalizador é utilizado como controle interno para normalizar os valores de mRNA e miRNA obtidos e diminuir efeitos de fatores não biológicos, como variações em passos do procedimento experimental, quantidade inicial de amostra, integridade de RNA, eficiência na síntese de cDNA e diferenças transcricionais em tecidos e células analisados (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008). A expressão deste gene não deve variar em tecidos e células, ou em resposta a um tratamento experimental (REBRIKOV; TROFIMOV, 2006). Alguns genes foram bastante estudados como bons normalizadores em plantas, como o RNA Ribossomal 18S (rRNA 18S), *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)*, *fator de alongamento 1 α (EF-1 α)*, *actina*, *α tubulina* e *β tubulina* (CZECHOWSKI et al., 2005). Muitas publicações destacam, entretanto, o fato de nenhum gene em particular ser capaz de preencher os critérios de um gene de referência universal. Ou seja, não há gene ideal para normalizar, portanto, cabe ao investigador identificar e validar o gene mais apropriado para as condições experimentais a utilizar (BUSTIN, 2002).

Portanto, quando a alteração abiótica interfere no desenvolvimento de raízes, a expressão de genes relacionados a este parâmetro será alterada. Essa alteração, quando sinalizada para plantas vizinhas, pode ser indicativa de comunicação entre as raízes.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu, no período de março a abril de 2016, em Botucatu, São Paulo, Brasil.

Para avaliarmos a possibilidade de ocorrência de comunicação entre raízes induzidas por diferentes tipos de sinalização, o modelo experimental proposto foi desenhado de acordo com a figura 1, onde foram utilizados três vasos com capacidade de 500 ml de solução nutritiva. Duas plantas foram utilizadas por repetição, sendo que a primeira planta teve a raiz separada em duas partes, onde uma parte permaneceu no vaso 1 e a segunda no vaso 2. A segunda planta também teve a raiz separada em duas partes, onde uma parte ficou no vaso 2 permitindo o contato com a raiz da primeira planta e a segunda parte ficou no vaso 3. No vaso 1 aplicamos as diferentes substâncias utilizadas com tratamentos. Apenas a planta um teve contato direto com as substâncias, caracterizando-a como planta tratada e a planta sem tratamento como planta vizinha.

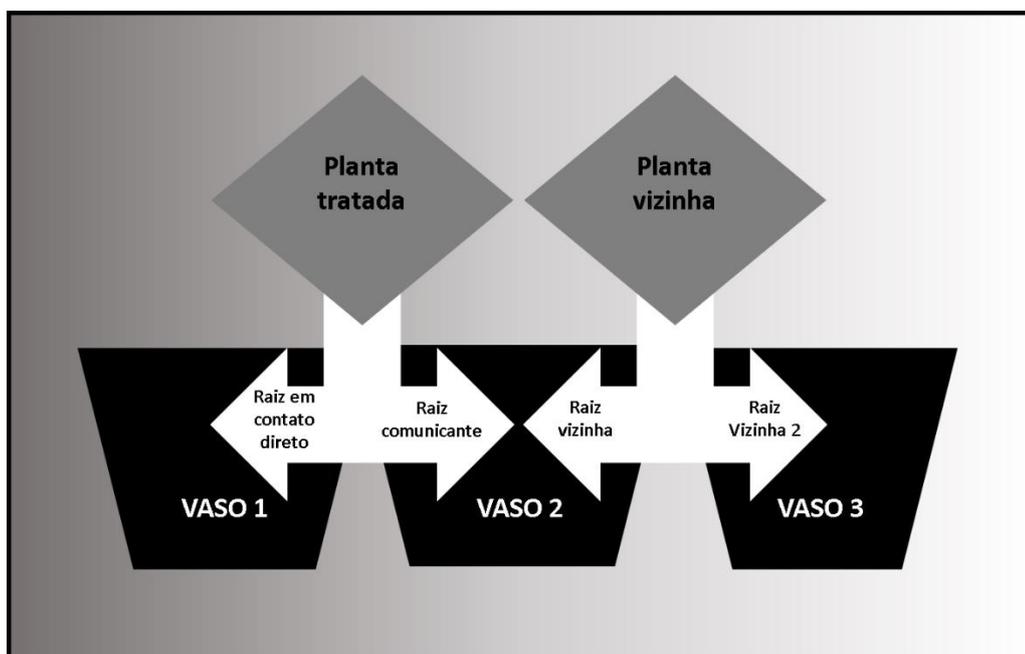


Figura 1. Modelo experimental para o estudo de comunicação entre raízes. Adaptado de Toledo (2015).

Sementes de *Sorghum bicolor* (sorgo) foram colocadas por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 5% e, posteriormente, lavadas 10 vezes com água destilada. As sementes esterilizadas foram colocadas em substrato para cultivo de plantas em bandejas para germinação de sementes, garantindo assim, bom enraizamento. Plântulas com 10 dias após a germinação, com comprimento da raiz e da parte aérea semelhantes foram selecionadas para transplante no meio hidropônico com aeração constante em solução nº2 de Hoagland e Arnon (1950) mantida com 50% da força iônica, com a condutividade elétrica em 1,2mS e pH em 6,2. Seis plântulas para cada tratamento e controle, foram aclimatadas nesta solução nutritiva pelo período de duas semanas, sendo que ao final da segunda semana, a solução nutritiva foi substituída por uma nova para a aplicação dos tratamentos e início do experimento (figura 2).



Figura 2. Condição de crescimento de plântulas de sorgo com 25 dias após a germinação em meio hidropônico com aeração constante em solução nº2 de Hoagland e Arnon (1950) com 50% de força iônica mantida e condutividade elétrica em 1,2mS e pH em 6,2. Botucatu, São Paulo, 2016.

Durante todo o período do experimento a condição da casa de vegetação foi monitorada, com a temperatura controlada em 25 ± 5 °C e umidade relativa do ar em 75 ± 5 % (figura 3).

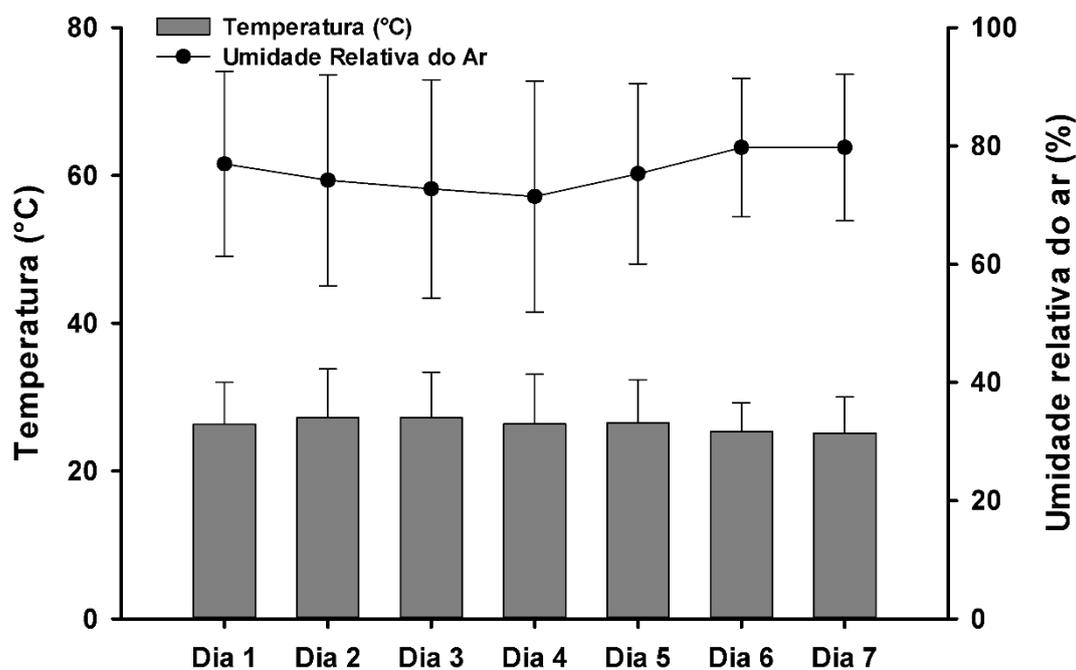


Figura 3. Caracterização da temperatura e umidade relativa do ar na casa de vegetação durante o experimento. Botucatu, São Paulo, Brasil.

5.1. Aplicação dos tratamentos para estímulo de respostas em raízes

Plântulas de sorgo com 25 dias de idade após a germinação foram tratadas com manitol, glifosato, extrato de folhas de *Copaifera langsdorffii* (extrato de copaíba), ácido indol-3-butírico (IBA) e rutina, por 168 horas, para observação do efeito de diferentes tipos de sinalização. Os tratamentos foram escolhidos de acordo com o tipo de alteração e possibilidades de sinalização. Para observar efeitos da deficiência hídrica foi utilizado tratamento com manitol a 505 mM (-1,27 MPa) (ALMANSOURI; KINET; LUTTS, 2001). Para observar a ação de efeito alelopático utilizamos extrato orgânico metanólico de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (extrato de copaíba ou ext. de copaíba) na concentração de 400 mg.L⁻¹, doses definidas com potencial de inibição de crescimento sem levar a planta à morte

(FRANCO et al., 2015a, 2015b, 2016), assim como rutina (flavonoide glicosídeo) na concentração de 10 μM , substâncias com estrutura e efeito semelhantes aos flavonoides majoritários encontrados no extrato vegetal testado. Outros efeitos que podem levar a uma rede de transdução de sinais e cascata de sinalização são os reguladores vegetais, assim, aplicamos o ácido indol-3-butírico (IBA) a 20 μM para cascata de sinalização dependente de auxina. Aplicamos também um herbicida comercial a base de glifosato a 100 μM , para observarmos os efeitos da sinalização de estresse causado por herbicida. O controle foi realizado utilizando apenas a solução nutritiva sem adição de nenhum tratamento, porém mantendo o desenho experimento de compartilhamento de raízes no mesmo vaso. Tanto o controle, como os tratamentos foram constituídos de três repetições, sendo que cada repetição foi composta por duas plantas com raízes distribuídas por três vasos de acordo com o modelo da figura 1.

5.2. Comprimento de raízes e parte aérea

Para mensurar o comprimento de raiz e da parte aérea das plantas de sorgo, foi utilizado uma régua graduada em milímetros, medindo a parte aérea a partir do início do caule até a prolongação da última folha completamente expandida, e a raiz, a partir do eixo caule – raiz até a ponta da raiz mais comprida. As medidas de cada planta foram mensuradas no dia da aplicação dos tratamentos e no último de dia de experimento. Estes dados foram utilizados para calcular a razão de crescimento, observando a diferença do comprimento final com o comprimento inicial. Os dados obtidos em milímetros (mm) foram convertidos em taxa de crescimento relativa ao controle (%) para apresentação gráfica.

5.3. Condutância estomática

As medidas de condutância estomática (g_s) foram efetuadas com a utilização de um porômetro em estado de equilíbrio dinâmico Leaf Porometer Modelo SC-1 (Decagon/EUA). Foram selecionadas folhas completamente expandidas para realizar as medidas. As análises foram realizadas as 10 horas da manhã. Foi realizada uma medida em cada planta tratada e vizinha. As medidas foram feitas no primeiro, terceiro, quinto, sexto e sétimo dia após a aplicação dos tratamentos.

5.4. Fluorescência da clorofila *a*

Foram selecionadas folhas completamente expandidas para realizar medidas das variáveis da fluorescência da clorofila *a* avaliadas com auxílio de fluorômetro PAM – Junior, Chlorophyll – Fluorometer (WALZ/Alemanha). Diversas variáveis fotoquímicas foram calculadas com base em parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: eficiência quântica máxima do PSII (F_V/F_M), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{PSII}) medido de acordo com GENTY; BRIANTAIS; BAKER (1989), taxa de transporte de elétrons ($ETR = \Delta F/F_m' \times DFFFA \times 0,5 \times 0,84$), (MAXWELL; JOHNSON, 2000) e a dissipação fotoquímica (qP), dissipação não fotoquímica (NPQ). Para a estimativa ETR, 0,5 foi usada como a fração de energia de excitação distribuída entre os fotossistemas e 0,84 como a fração de absorção de luz (BAKER, 2008). As folhas amostradas foram aclimatadas no escuro por 30 minutos. As análises foram realizadas através do método de curva de indução, utilizando um método adaptado manualmente, previamente testado proporcionando melhor resolução dos dados obtidos. Esse método consiste na determinação da fluorescência basal (F_0), seguido de um pulso de luz de $10000 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ DFFFA (Densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos) para determinação da fluorescência máxima (F_M) e conseqüentemente o valor da eficiência quântica máxima do PSII (F_V/F_M). Após esse passo, foi determinado um tempo de

espera de 40 segundos com ausência de luz seguida da aplicação de luz actínica com intensidade de $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ de DFFFA por 60 segundos para determinação dos demais parâmetros. Os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* foram aferidos através de fluorômetro no horário das 10 horas da manhã, para verificação das variações na fluorescência emitida em função dos tratamentos utilizados ou da comunicação emitida pela planta tratada na planta vizinha. Os dados de ϕ_{PSII} , qP , NPQ e F_v/F_M foram coletados no sétimo dia após aplicação dos tratamentos. Os dados de ETR foram obtidos no terceiro, quinto e sexto dia após a aplicação dos tratamentos.

5.5. Conteúdo relativo de água

Folhas completamente expandidas foram selecionadas para avaliação do conteúdo relativo de água (CRA) de acordo com o método descrito por ELSHEERY; CAO (2008). Discos foliares com 2 cm de diâmetro foram pesados imediatamente para obtenção da massa fresca (MF). Em seguida, as amostras foram colocadas em placas de Petri, com papel de filtro, imersos em água deionizada e acondicionados por 24 horas a 5 °C para reidratação. Após esse período, as amostras foram pesadas obtendo o valor da massa túrgida (MT) e, em seguida, levadas à estufa (temperatura ≈ 60 °C até massa constante) para obtenção da massa seca (MS) das amostras. Foi utilizada balança de precisão para determinação das massas fresca, túrgida e seca. A determinação do CRA foi feita de acordo com SMART; BINGHAM (1974), utilizando-se a fórmula:

$$\text{CRA (\%)} = \frac{(\text{MF} - \text{MS})}{(\text{MT} - \text{MS})} * 100$$

5.6. Trocas gasosas

As trocas gasosas foram avaliadas utilizando-se equipamento de sistema aberto com analisador de gás (CO₂) e vapor d'água por radiação infravermelha (*Gas-Exchange and*

Fluorescence System, GFS-3000, Walz), ao sétimo dia após aplicação do tratamento, com o dia ensolarado, durante o período das 9:00 as 11:00h com duração aproximada de 2,5 minutos entre uma repetição e outra.

A concentração de CO₂ de referência utilizada durante as avaliações foi a presente no ambiente, a qual variou de 380 a 400 μmol mol⁻¹ e com luz saturante de 1500 μmol/m²s de DFFFA. Foram analisadas as seguintes variáveis de trocas gasosas: taxa de assimilação líquida de CO₂ (A_{net} , μmol CO₂ m⁻²s⁻¹), taxa transpiratória (E , mmol vapor d'água m⁻² s⁻¹) e eficiência do uso da água (WUE , μmol CO₂ (mmol H₂O)⁻¹).

5.7. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD, EC. 1.15.1.1) peroxidase (POD, EC. 1.11.1.7) e catalase (CAT, EC. 1.11.1.6) foram coletadas amostras de folhas e raízes de cada repetição ao sétimo dia após a aplicação dos tratamentos. As amostras foram maceradas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido e posteriormente armazenada em ultra freezer a -80 °C.

5.7.1 Determinação de proteínas totais

Para determinar a atividade específica das enzimas antioxidantes foi necessário determinar a concentração de proteínas em folhas e raízes. Para isso foi utilizada a metodologia descrita por Bradford (1976). 100 mg do material de folhas e raízes foram macerados em 2 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L em pH 6,8 com adição de 100 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). O material vegetal foi centrifugado a 14000 x g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado com auxílio de pipeta e utilizado como extrato para determinação de proteínas totais. A solução utilizada na determinação da concentração de proteínas foi preparada com 100 mg de *coomassie brilliant blue* G-250 dissolvido em 50

ml de etanol 95%, com adição de 100 ml de ácido fosfórico 85 % (m/v) e a solução resultante foi diluída em água deionizada para um volume final de 1 L e posteriormente filtrada para retirar o excesso de corante.

A curva padrão utilizada para os cálculos da concentração de proteínas foi feita utilizando 100, 80, 60, 40, 20 e 0 µg de proteína (Caseína) com posterior adição solução corante. A solução resultante foi levada para leitura da absorbância em espectro fotômetro a 595 nm.

Para as folhas e raízes 100 µl do extrato foram adicionados em um tubo de ensaio. Em seguida foi adicionado 2,5 ml da solução corante e os tubos foram agitados em agitador de tubos vortex. As leituras das amostras foram feitas após 15 minutos em espectrofotômetro a 595nm, utilizando a solução corante como branco.

5.7.2 *Catalase (CAT, EC. 1.11.1.6)*

Para a determinação da atividade da CAT, o sistema de reação foi mantido a 20 °C por 60 segundos, composto por 50 µL de extrato enzimático, 950 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, suplementado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 12,5 mM, num volume final de 1 mL. A leitura da absorbância foi realizada a 240 nm, e foi utilizada para os cálculos do coeficiente de extinção molar do H₂O₂ em consideração a concentração de proteínas totais. A atividade específica foi expressa em Kat µg Prot⁻¹.

5.7.3 *Peroxidase (POD, EC. 1.11.1.7)*

Para a determinação da atividade da POD em folhas e raízes foi utilizado 100 µL de extrato enzimático bruto. Posteriormente, foi adicionado 4,9 mL de solução tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 contendo 20 mM de Pyrogallol e 20 mM de H₂O₂. Após incubação por 1 min a reação foi paralisada com adição de 0,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 5 %. A

leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 420 nm. O cálculo da atividade específica de POD foi realizado utilizando em consideração o conteúdo de proteínas totais. A atividade específica foi expressa em $\mu\text{Kat } \mu\text{g Prot}^{-1}$.

5.7.4 *Superoxido dismutase (SOD, EC. 1.15.1.1)*

Para a determinação da atividade da SOD, utilizamos o método de BEAUCHAMP; FRIDOVICH (1971) citados por BOR; ÖZDEMIR; TÜRKAN (2003). O sistema de reação foi composto de 100 μL de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, mistura *nitroblue tetrazolium* (NBT) 75 μM + EDTA 10 nM e riboflavina 2 μM , totalizando um volume de 3.0 mL. Após iluminação (15 W) dos tubos por cinco minutos a 25°C. Após o final da catálise, mensuramos a redução do NBT a formazana por leituras de absorbância em espectrofotômetro UV-visível a 560 nm. A atividade da SOD foi calculada considerando a quantificação de proteínas totais. A atividade específica é expressa em $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. Neste caso, uma unidade (U) representa a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a razão de redução do NBT, portanto os dados são apresentados em % de redução da fotorredução.

5.7.5 *Extravasamento de eletrólitos e análise da clorofila a*

A integridade e permeabilidade de membrana plasmática foi avaliada observando a técnica de extravasamento de eletrólitos. Para isso foram 10 discos foliares de cada repetição, com 1 cm de diâmetro cada. Os discos foram imersos em solução manitol a 0,3 M e mantidos em agitação por 24h. Ao final do período de incubação foi medido a condutividade elétrica da solução (C1). Os frascos foram pesados e aquecidos até o ponto de ebulição da solução por 10 minutos. Após o resfriamento, foram novamente pesados e repostos a diferença da solução que evaporou foi repostada com água deionizada e mantidos sob agitação durante 30 minutos. Após

esse período outra leitura da condutividade foi realizada (C2). Assim a perda de eletrólitos foi calculada fórmula: Extravasamento de eletrólitos = $(C1/C2) \times 100$, e foi expressa em porcentagem do extravasamento de eletrólitos.

Para extração e análise da clorofila a foram utilizados 2 discos de 1 cm de diâmetro, imersos em 2 mL dimetilformamida (DMF) por 24h. Para determinação das clorofilas 2 mL da solução foi adicionada a uma cubeta de vidro e foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro nos seguintes comprimentos de onda: 480, 646,8 e 663,8 nm. O espectrofotômetro foi zerado utilizando apenas DMF. A clorofila a foi determinada pela seguinte fórmula: $(12 \times \text{absorbância } 663,8\text{nm}) - (3,11 \times \text{absorbância } 646,8\text{nm})$.

5.8. *Análises da expressão de genes do desenvolvimento de raiz*

5.8.1 Isolamento, quantificação do RNA total e síntese de cDNA RT-PCR

Isolamos o RNA total de todas as amostras seguindo-se as recomendações do kit *SV Total RNA Isolation System* (PROMEGA). Utilizamos raízes de cada repetição dos tratamentos e controle para maceração com auxílio de nitrogênio líquido.

Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com 2 μ l de *DNase I Amplification Grade* (INVITROGEN), seguindo as recomendações do fabricante para a remoção total do DNA genômico das amostras. Em seguida foi verificada a integridade das amostras de RNA por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com 0,001 % (v/v) de brometo de etídio, em tampão de corrida TAE 1x (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA) com tensão constante de 130 V. Avaliamos a concentração e pureza do RNA por espectrofotometria de absorção. A ausência de DNA genômico nas amostras de RNA total, foi realizada por meio da realização de PCR usando iniciadores específicos para os genes endógenos.

Utilizamos o RNA total tratado com enzima *DNase I*, para a síntese da primeira fita de cDNA por RT-PCR. Adicionamos oligodT junto ao iniciador randômico (*random primer*), para normalização da quantidade de cDNA utilizado em cada reação de PCR. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 2 µg do RNA total purificado, usando o Kit *Improm-II Reverse Transcriptase* (PROMEGA). Adicionamos ao RNA 1µl de dNTP 10mM, 1µl de oligodT (500 ng/µl), juntamente com o iniciador randômico. As amostras foram incubadas a 70 °C por 10 minutos. Em seguida, adicionamos 5 µl de *Improm-II 5x Reaction Buffer*, 2.4 µl de MgCl₂ 25mM, 0,6 µl de inibidor de RNase *Ribolock* (FERMENTAS) e 1 µl da enzima *Improm-II Reverse Transcriptase*. As reações foram encubadas em termociclador a 94 °C por 2 minutos, seguidas por transcrição reversa de 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. Para inativação da enzima *Improm-II Reverse Transcriptase*, a reação foi incubada a 72°C durante 15 minutos. Posteriormente, armazenaremos as reações a -20°C.

5.8.2 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

Desenhemos iniciadores específicos baseados nas sequências identificadas, levando em consideração características como T_m (temperatura de fusão), a formação de dímeros (*cross-dimers* e *self-dimers*) e a formação de estruturas secundárias (*hairpins*), analisadas no software *PCR Primer Stats* (http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html).

Realizamos as reações de amplificação RT-qPCR em volume final de 20 µl, utilizando 4 µl de cDNA na diluição de 1:10 (v:v), 0,4 de cada iniciador na concentração de 10 mM, 10 µl de *GoTaq qPCR Master Mix* (PROMEGA), 0,18 µl de *reference* e 5,02 água *milli-Q*. A amplificação ocorreu em termociclicador *7300 Real-Time PCR System* (APPLIED BIOSYSTEMS). O programa utilizado foi: 95°C por 2 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada

etapa de extensão. Após a essa etapa, curvas de dissociação foram determinadas para cada ponto amplificado (curva de *melting*). Realizamos todas as reações em duplicatas técnicas, incluindo uma amostra controle não tratada (NTC) contendo somente água *milli-Q*.

Foi utilizado o método relativo para análise da expressão gênica, em relação à quantidade relativa de transcritos de outro gene, cuja expressão é adotada como constante denominado gene normalizador. Calculamos a expressão relativa pelo método descrito por PFAFFL (2001), onde a razão de expressão relativa dos genes alvo é calculada com base na sua eficiência e na diferença de Ct (ΔCt) de uma amostra desconhecida (tratamento) *versus* um controle (controle - tratamento). A eficiência foi calculada utilizando o *slope* dado pela curva padrão de diluições 1; 0,1; 0,01 e 0,001. Os dados obtidos foram calculados utilizando programa *Relative expression software tool* (REST) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

5.9. Obtenção dos dados e análise estatística

Os dados foram obtidos a partir de três repetições biológicas e foram submetidos aos testes de normalidade e igualdade de variância, foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância (One Way ANOVA). Foram comparadas as médias das plantas tratadas e vizinhas entre elas e com os controles. Quando as médias apresentavam diferença estatística, foram comparadas através do teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todas as médias dos controles 1 e 2 (mesmo modelo experimental realizado com os tratamentos com substâncias aplicadas, apenas com solução nutritiva) foram avaliadas por ANOVA e não apresentaram diferenças entre elas. Por isso os dados foram apresentados graficamente com as médias dos controles e não controle 1 e 2.

7. RESULTADOS

7.1. *Efeitos no crescimento vegetal*

A razão entre o comprimento inicial e final de raízes (figura 4) e parte aérea (figura 5), aponta para o efeito dos tratamentos durante o tempo de experimentação no desenvolvimento desses órgãos vegetais, onde podemos observar que raízes tratadas com manitol, glifosato e extrato de copaíba, apresentam redução no desenvolvimento das plantas tratadas e a sinalização induz a redução em raízes de plantas vizinhas. As plantas tratadas com IBA e a sinalização gerada para as plantas vizinhas levaram a redução em relação ao controle, porém a redução nas plantas tratadas foi maior, apresentando diferença também em relação as plantas vizinhas. As plantas tratadas com rutina apresentaram redução no comprimento em relação ao controle, já as raízes das plantas vizinhas não diferiram do controle, mas apresentam comportamento oposto ao observado nas plantas tratadas.

Quanto a razão entre comprimento inicial e final de parte aérea, as plantas tratadas com manitol e suas vizinhas apresentaram redução em relação ao controle, porém essa redução foi maior nas plantas tratadas, indicando diferença em relação as plantas vizinhas. As plantas tratadas com glifosato não apresentaram diferença em relação ao controle, porém suas vizinhas apresentaram maior desenvolvimento da parte aérea. Plantas tratadas com extrato de copaíba não apresentaram diferença em relação ao controle, porém as plantas vizinhas apresentaram redução. As plantas tratadas com rutina e IBA não apresentaram diferença relativa ao controle, porém observamos um aumento nas plantas vizinhas. Portanto, podemos observar que as plantas vizinhas apresentaram diferenças relativas ao controle, indicando alterações no crescimento, possivelmente em função de sinal recebido pela planta tratada.

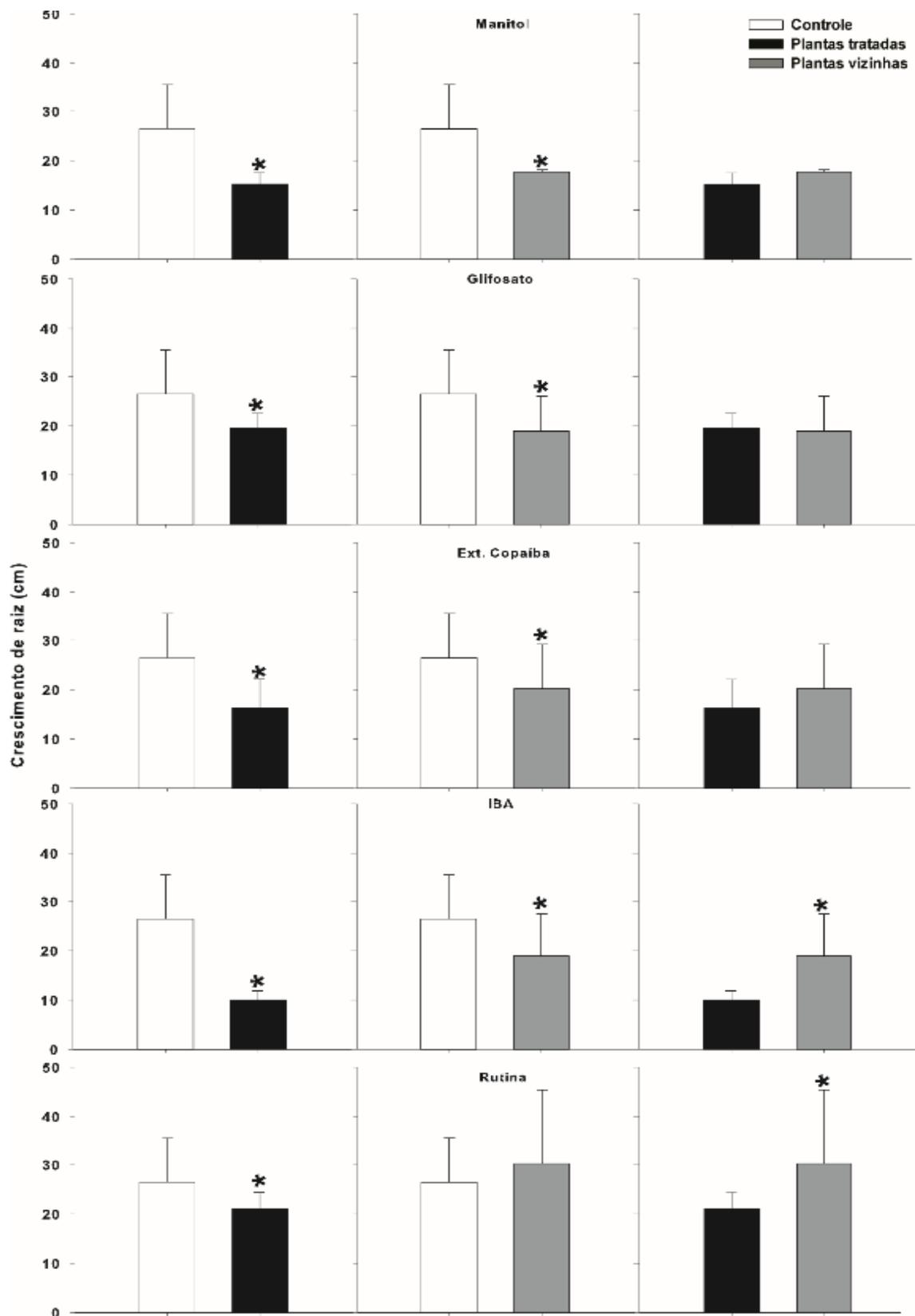


Figura 4. Comprimento de raízes em plantas de sorgo submetidas a diferentes tratamentos. A diferença ($P < 0,05$) é representada pelo *. A ausência indica que não houve diferença significativa.

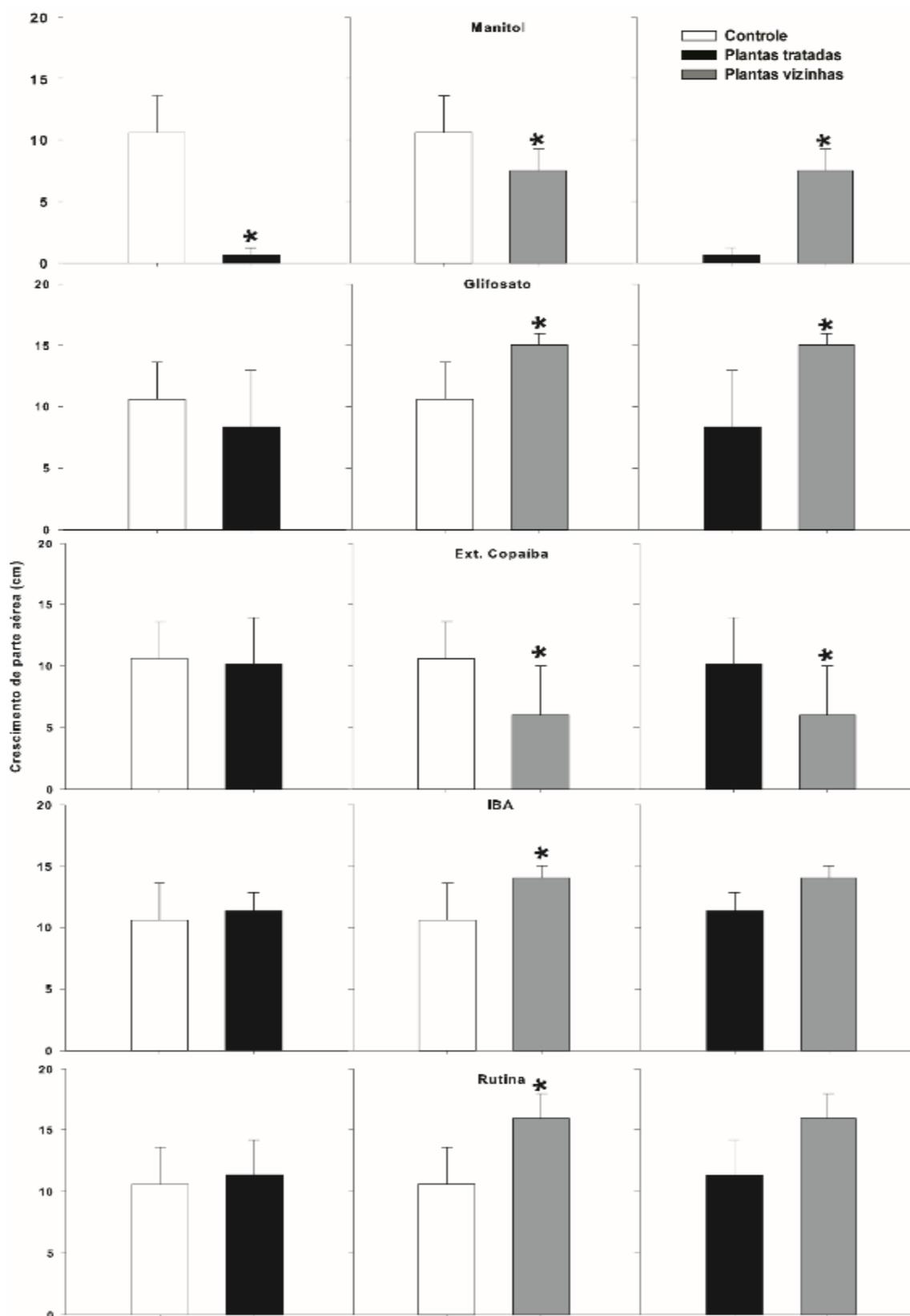


Figura 5. Comprimento da parte aérea em plantas de sorgo submetidas a diferentes tratamentos. A diferença ($P < 0,05$) é representada pelo *. A ausência indica que não houve diferença significativa.

7.2. Trocas gasosas e relações hídricas

A condutância estomática (g_s) foi reduzida pela aplicação de manitol (figura 6A), apresentando diferença em relação ao controle em todos os dias analisados. As plantas vizinhas também apresentaram redução nesse parâmetro 3 dias após aplicação do tratamento, porém em menor escala seguida de recuperação nos dias posteriores. Em plantas tratadas com glifosato (figura 6B) observamos efeito semelhante às tratadas com manitol, onde plantas tratadas e vizinhas apresentaram redução de g_s no terceiro dia após a aplicação do tratamento. Porém tanto as plantas vizinhas como às tratadas apresentaram recuperação nos dias posteriores. As plantas tratadas com extrato de copaíba e suas vizinhas não apresentaram alteração nesse parâmetro (figura 6C). O tratamento com IBA levou à redução de g_s nas plantas tratadas e vizinhas no terceiro dia após a aplicação do tratamento, e no sétimo dia observamos elevação nos níveis de g_s em plantas vizinhas (figura 6D). O tratamento com rutina (figura 6E) apresentou efeito semelhante ao tratamento com glifosato, onde plantas tratadas e vizinhas apresentaram redução de g_s no terceiro dia após a aplicação do tratamento. Porém tanto as plantas vizinhas como às tratadas apresentaram recuperação nos dias posteriores. Portanto, quando o tratamento altera a condutância estomática, a planta vizinha também apresenta alteração nesse parâmetro apresentando recuperação posterior.

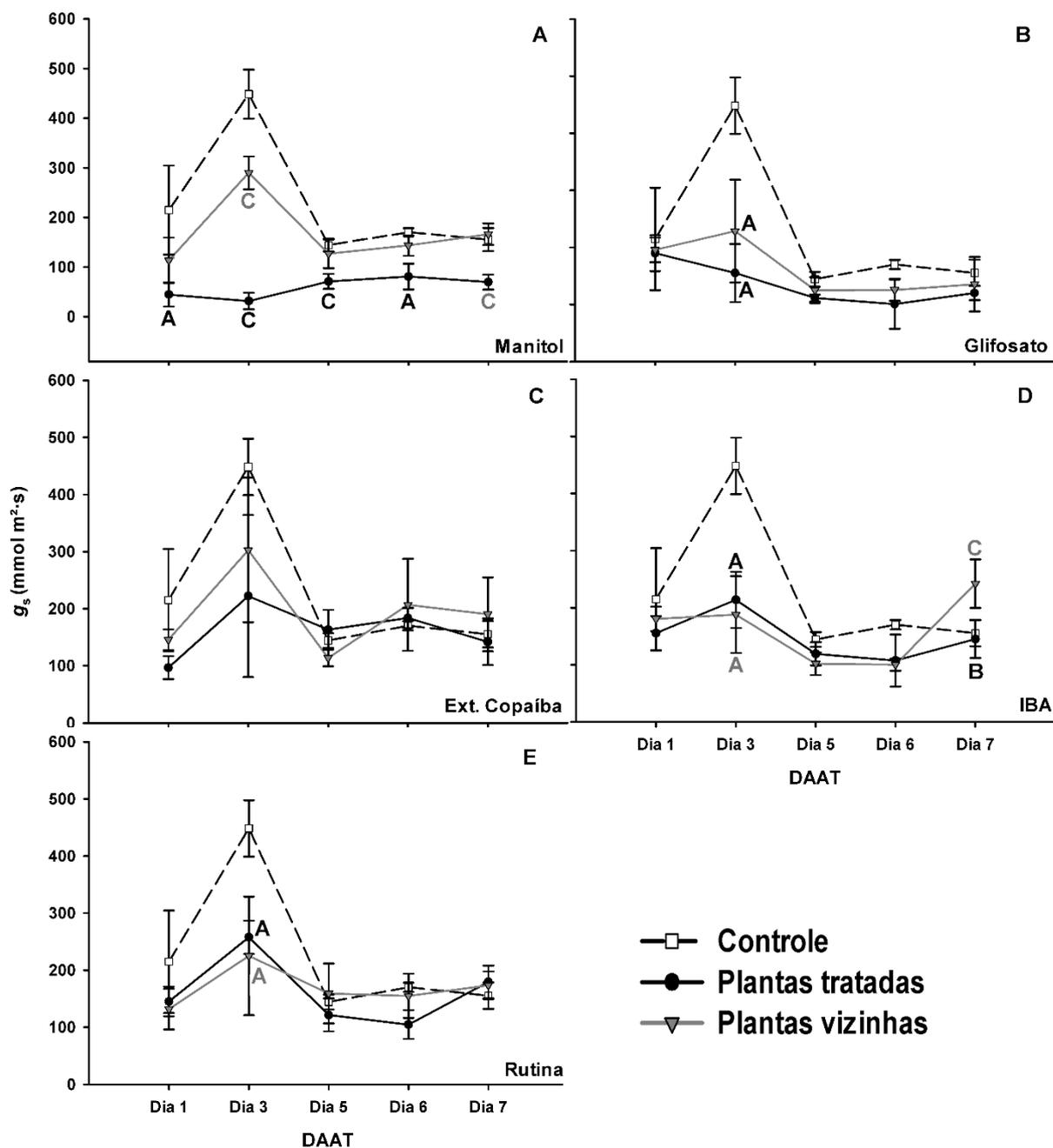


Figura 6. Comparação da condutância estomática das plantas tratadas, plantas controle e plantas vizinhas ao longo dos dias de tratamento. **DAAT:** dias após aplicação do tratamento. As diferenças ($P < 0,05$) são representadas pelas letras: ^A que indica diferença em relação ao controle, letra ^B que indica diferença relativa a planta vizinha e letra ^C que indica diferença em relação ao controle e a planta vizinha. A ausência das letras indica que não houve diferença significativa.

A taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) analisada ao sétimo dia após aplicação dos tratamentos (tabela 1), apresentou redução pelos tratamentos com manitol, glifosato, extrato de copaíba e rutina. Já o tratamento com IBA apresentou elevação na taxa de assimilação de

CO₂. Nas plantas vizinhas, a taxa de assimilação de CO₂ não diferiu do controle. As taxas de transpiração (*E*) e a eficiência do uso da água (*WUE*) (material suplementar) analisadas ao sétimo dia após aplicação dos tratamentos não indicaram nenhum efeito, após esse período, em função dos tratamentos aplicados. Com isso, observamos que apesar dos tratamentos alterarem a assimilação de CO₂, as plantas vizinhas não apresentaram nenhuma alteração da taxa de assimilação, não havendo indicativo de sinalização pelas plantas tratadas para alteração desse parâmetro.

Tabela 1. Taxa de assimilação de líquida de CO₂ em plantas de sorgo, após o sétimo dia sob efeito dos diferentes tratamentos aplicados.

Tratamento	<i>A_{net}</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	ANOVA	<i>P</i>
Controle	19,60 ± 1,63	-	-
Manitol (Tratamento)	14,01 ± 3,87	C	0,044
Manitol (Vizinho)	23,18 ± 3,63	B	0,005
Glifosato (Tratamento)	14,93 ± 1,33	C	0,009
Glifosato (Vizinho)	20,57 ± 2,03	B	0,003
Ext. copaíba (Tratamento)	13,08 ± 3,16	C	0,013
Ext. copaíba (Vizinho)	20,98 ± 4,61	B	0,013
IBA (Tratamento)	24,22 ± 2,04	C	0,007
IBA (Vizinho)	20,75 ± 0,36	B	0,025
Rutina (Tratamento)	11,64 ± 1,31	C	0,010
Rutina (Vizinho)	24,75 ± 5,19	B	<0,001

Os dados foram analisados usando *one-way* ANOVA e teste Tukey. Média ± Desvio padrão. Diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação ao controle indicada pela letra **A**, em relação as plantas vizinhas pela letra **C** e em relação as plantas tratadas e vizinhas pela letra **C**.

No conteúdo relativo de água (CRA) (figura 7) observamos redução apenas no tratamento com manitol e nas plantas vizinhas a esse tratamento. No tratamento com extrato de copaíba observamos aumento no CRA das plantas tratadas em relação ao controle e, ainda, nas plantas vizinhas o CRA aumentou significativamente em relação ao controle e também em relação as plantas tratadas. As plantas tratadas com IBA e suas vizinhas apresentaram aumento relativo ao controle. Já nos tratamentos com glifosato e rutina não encontramos alterações no CRA.

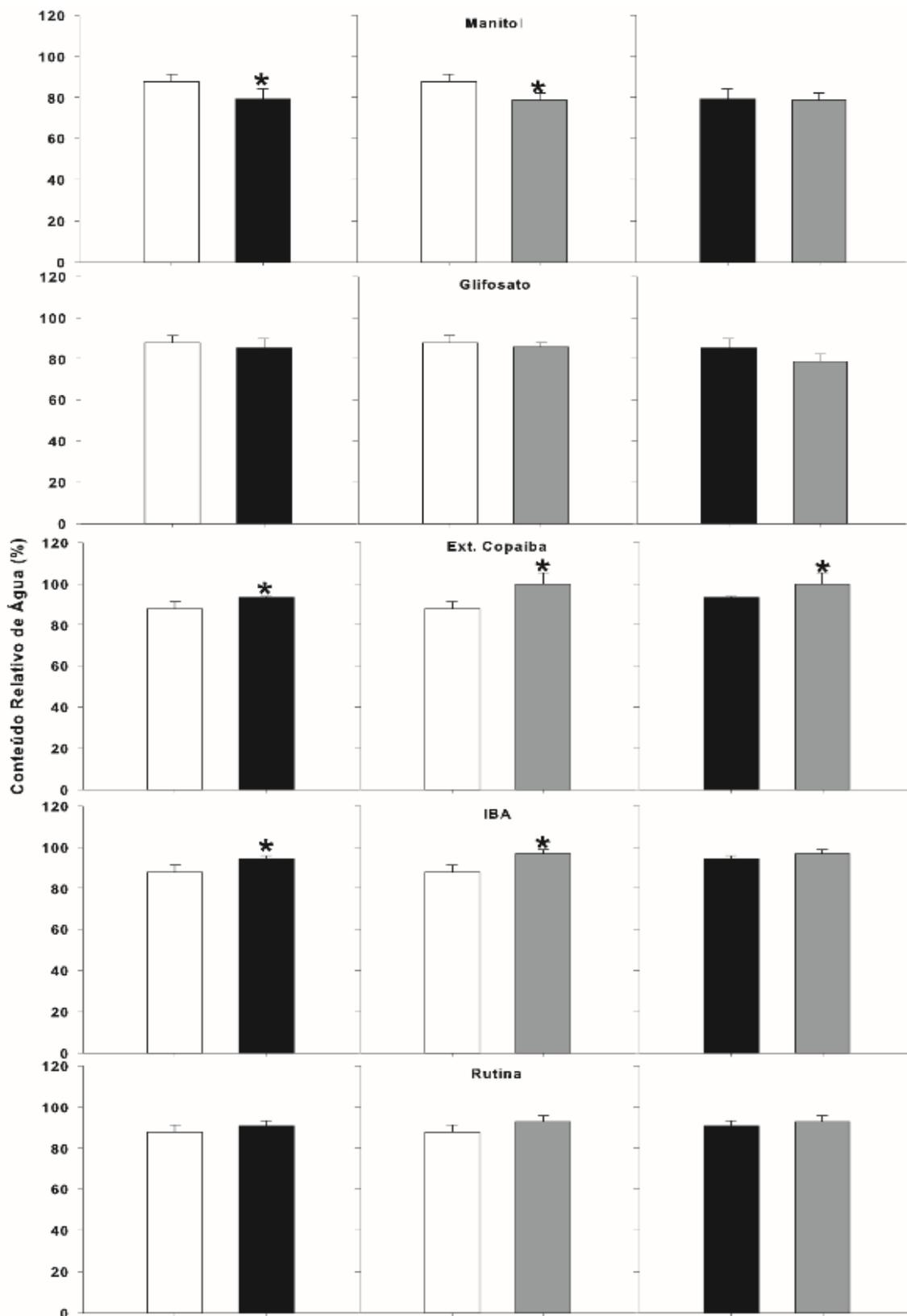


Figura 7. Conteúdo relativo de água de folhas de sorgo estimado no último dia de experimento. A diferença ($P < 0,05$) é representada pelo *. A ausência indica que não houve diferença significativa.

7.3. Fluorescência da clorofila *a*

Os resultados obtidos das análises de fluorescência da clorofila *a* apresentaram variações para os diferentes parâmetros avaliados. A taxa de transporte de elétrons (ETR) das plantas tratadas com manitol (tabela 2) foi reduzida significativamente em relação controle após aplicação do tratamento, já as plantas vizinhas apresentaram redução da ETR no quinto dia após aplicação do tratamento e apresentarem recuperação no dia posterior. O tratamento com extrato de copaíba causou redução da ETR nas plantas tratadas e vizinhas no terceiro dia após aplicação do tratamento apresentando recuperação nos dias posteriores. Portanto, observamos que alteração desse parâmetro variou em função do tipo de tratamento aplicado, bem como o padrão de resposta da planta vizinha.

Tabela 2 Taxa de transporte de elétrons em plantas de sorgo submetidas a diferentes tratamentos em relação ao controle.

Tratamentos	Dia 3		Dia 5		Dia 6	
	ETR	ANOVA	ETR	ANOVA	ETR	ANOVA
Controle	116,46	-	118,56	-	105,05	-
Manitol						
Plantas tratadas	63,73	C	83,06	A	65,01	A
Plantas vizinhas	97,30	B	64,63	A	87,42	ns
Glifosato						
Plantas tratadas	125,56	ns	135,43	ns	75,26	ns
Plantas vizinhas	105,00	ns	105,86	ns	90,20	ns
Extrato de Copaíba						
Plantas tratadas	73,16	A	94,83	ns	90,55	ns
Plantas vizinhas	72,76	A	107,70	ns	85,50	ns
IBA						
Plantas tratadas	110,63	ns	116,96	ns	108,16	ns
Plantas vizinhas	114,03	ns	108,73	ns	74,83	ns
Rutina						
Plantas tratadas	117,60	ns	104,53	ns	93,50	ns
Plantas vizinhas	110,86	ns	135,50	ns	83,23	ns

As diferenças ($P < 0,05$) são representadas pelas letras: ^A que indica diferença em relação ao controle, letra ^B que indica diferença relativa a planta vizinha e letra ^C que indica diferença em relação a planta vizinha e controle. ^{ns} indica que não houve diferença significativa.

No rendimento quântico máximo (F_v/F_M) (tabela 3), observamos redução no sétimo dia após a aplicação do tratamento apenas em plantas tratadas com manitol. Nos demais tratamentos nenhuma diferença foi encontrada no F_v/F_M . Os outros parâmetros observados - rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}), dissipação fotoquímica (qP), dissipação não fotoquímica (NPQ) e conteúdo de clorofila a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) - não sofreram alterações em relação ao controle e nem em relação as plantas vizinhas em nenhum dos tratamentos aplicados. Portanto, observamos que o tratamento com manitol pode ter apresentado alteração da ETR em função da fotoinibição observada. Enquanto a redução observada nas plantas tratadas com extrato de copaíba, podem ser associadas com a capacidade oxidativa das moléculas presentes no extrato. Esse parâmetro também pode ser sinalizado pela planta tratada para planta vizinha, levando-a a apresentar resposta semelhante.

Tabela 3: Média do rendimento quântico efetivo (Φ_{PSII}), dissipação fotoquímica (qP), dissipação não fotoquímica (NPQ), rendimento quântico máximo (F_v/F_M) e conteúdo de clorofila a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) no sétimo DAAT, em sorgo comparadas com o controle e entre as plantas tratadas e vizinhas de cada tratamento aplicado.

Tratamentos	Φ_{PSII}	qP	NPQ	F_v/F_M	Clorofila a
Controle	0,147	0,256	1,439	0,732	15,112
Manitol	$\Phi_{P,PSII}$	qP	NPQ	F_v/F_M	Clorofila a
Plantas tratadas	0,107 ^{ns}	0,180 ^{ns}	1,177 ^{ns}	0,441 ^C	14,947 ^{ns}
Plantas vizinhas	0,151 ^{ns}	0,234 ^{ns}	1,048 ^{ns}	0,748 ^B	18,580 ^{ns}
Glifosato	Φ_{PSII}	qP	NPQ	F_v/F_M	Clorofila a
Plantas tratadas	0,119 ^{ns}	0,185 ^{ns}	0,928 ^{ns}	0,777 ^{ns}	13,810 ^{ns}
Plantas vizinhas	0,143 ^{ns}	0,242 ^{ns}	1,474 ^{ns}	0,734 ^{ns}	12,509 ^{ns}
Ext. Copaíba	Φ_{PSII}	qP	NPQ	F_v/F_M	Clorofila a
Plantas tratadas	0,121 ^{ns}	0,215 ^{ns}	1,507 ^{ns}	0,723 ^{ns}	13,026 ^{ns}
Plantas vizinhas	0,126 ^{ns}	0,223 ^{ns}	1,739 ^{ns}	0,736 ^{ns}	11,517 ^{ns}
IBA	Φ_{PSII}	qP	NPQ	F_v/F_M	Clorofila a
Plantas tratadas	0,154 ^{ns}	0,239 ^{ns}	1,259 ^{ns}	0,764 ^{ns}	15,157 ^{ns}
Plantas vizinhas	0,109 ^{ns}	0,191 ^{ns}	1,655 ^{ns}	0,765 ^{ns}	15,439 ^{ns}
Rutina	Φ_{PSII}	qP	NPQ	F_v/F_M	Clorofila a
Plantas tratadas	0,178 ^{ns}	0,309 ^{ns}	1,652 ^{ns}	0,760 ^{ns}	13,740 ^{ns}
Plantas vizinhas	0,154 ^{ns}	0,253 ^{ns}	1,611 ^{ns}	0,751 ^{ns}	12,390 ^{ns}

Os dados foram analisados usando *one-way* ANOVA e teste Tukey. As diferenças ($P < 0,05$) são representadas pelas letras: ^A que indica diferença em relação ao controle, letra ^B que indica diferença relativa a planta vizinha e letra ^C que indica diferença em relação a planta vizinha e controle. ^{ns} indica que não houve diferença significativa.

7.4. Atividade de enzimas antioxidantes

Analisando as enzimas antioxidantes (tabela 4) não encontramos alterações provocadas por nenhum tratamento na atividade da catalase (CAT) nas folhas e em raízes. Porém as folhas das plantas tratadas com glifosato apresentaram aumento na atividade da enzima peroxidase (POD), já em raízes a atividade da POD apresentou aumento tanto em plantas tratadas com em plantas vizinhas. Também observamos aumento na atividade de POD nas raízes das plantas vizinhas ao tratamento com manitol. Os outros tratamentos não apresentaram alteração na atividade de POD. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas e raízes, não apresentou alteração causada por nenhum tratamento. O extravasamento de eletrólitos (material suplementar) também não apresentou alterações significativas em relação ao controle e nem as plantas vizinhas aos tratamentos. Com isso, observamos que os tratamentos com maior potencial para causar dano oxidativo, foram manitol e glifosato e levando a sinalização para ativação da enzima peroxidase.

Tabela 4. Atividade específica de enzimas antioxidantes: catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) em folhas e raízes.

Tratamentos	CAT		POD		SOD	
	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz
Controle	0,12	0,05	279,54	219,67	49,99	9,20
Manitol						
Plantas tratadas	0,08 ^{ns}	0,04 ^{ns}	445,87 ^{ns}	262,80 ^B	67,03 ^{ns}	12,92 ^{ns}
Plantas vizinhas	0,08 ^{ns}	0,10 ^{ns}	305,35 ^{ns}	546,47 ^C	58,52 ^{ns}	12,35 ^{ns}
Glifosato						
Plantas tratadas	0,07 ^{ns}	0,02 ^{ns}	761,73 ^C	598,89 ^C	76,74 ^{ns}	22,79 ^{ns}
Plantas vizinhas	0,03 ^{ns}	0,02 ^{ns}	465,95 ^B	408,59 ^C	65,70 ^{ns}	15,12 ^{ns}
Extrato de Copaíba						
Plantas tratadas	0,22 ^{ns}	0,01 ^{ns}	460,19 ^{ns}	308,34 ^{ns}	63,54 ^{ns}	16,04 ^{ns}
Plantas vizinhas	0,11 ^{ns}	0,03 ^{ns}	485,96 ^{ns}	271,11 ^{ns}	65,11 ^{ns}	16,54 ^{ns}
IBA						
Plantas tratadas	0,02 ^{ns}	0,03 ^{ns}	287,51 ^{ns}	288,80 ^{ns}	46,34 ^{ns}	10,52 ^{ns}
Plantas vizinhas	0,05 ^{ns}	0,07 ^{ns}	492,16 ^{ns}	291,42 ^{ns}	72,50 ^{ns}	10,74 ^{ns}
Rutina						
Plantas tratadas	0,18 ^{ns}	0,06 ^{ns}	462,29 ^{ns}	201,54 ^{ns}	72,40 ^{ns}	11,03 ^{ns}
Plantas vizinhas	0,07 ^{ns}	0,03 ^{ns}	396,58 ^{ns}	192,46 ^{ns}	68,40 ^{ns}	11,09 ^{ns}

As diferenças ($P < 0,05$) são representadas pelas letras: ^A que indica diferença em relação ao controle, letra ^B que indica diferença relativa a planta vizinha e letra ^C que indica diferença em relação a planta vizinha e controle. ^{ns} indica que não houve diferença significativa.

7.5. Expressão de genes relacionados ao desenvolvimento radicular

A expressão dos genes (tabela 5) foi o parâmetro onde observamos maior alteração para os tratamentos com manitol, glifosato e extrato de copaíba. No tratamento com manitol o gene *SHORT-ROOT (SHR)* apresentou aumento na expressão em plantas tratadas e vizinhas de 3,026 e 9,042 respectivamente. Dos genes da classe III de fatores de transcrição *homeodomain-leucine zipper (HD-Zip III)* apenas o gene *PHABULOSA (PHB)* apresentou aumento na expressão, 5,349 vezes em plantas tratadas e 2,691 vezes em plantas vizinhas. Os genes *PHAVOLUTA (PHV)* e *REVOLUTA (REV)* não apresentaram diferenças em relação ao controle. As plantas tratadas com glifosato apresentaram aumento na expressão de todos os genes avaliados. Observamos aumento da expressão em 11,833 vezes em *SHR*, 10,074 vezes em *PHB*, 1,777 vezes em *PHV* e 5,928 vezes em *REV*. Nas plantas vizinhas desse tratamento observamos aumento de 8,866 vezes em *SHR* e 2,237 vezes em *PHB*. As plantas tratadas com

extrato de copaíba apresentaram aumento de 12,921 vezes em *SHR* e 9,481 vezes em *PHB*. Nas plantas vizinhas observamos aumento de 3,947 vezes na expressão do gene *SHR*, e regulação negativa de 0,551 vezes na expressão do gene *PHV*. As plantas dos grupos IBA e rutina não apresentaram diferença na expressão em nenhum dos genes avaliados. Portanto, observamos que a expressão diferenciada dos genes aqui analisados, ocorre quando há aplicação de substâncias extrínsecas ao metabolismo vegetal. Ainda, as plantas em contato com essas substâncias sinalizam para plantas vizinhas, que também apresentam alteração na expressão desses genes.

Tabela 5. Expressão relativa dos genes *SHR*, *PHB*, *PHV* e *REV* em raízes de sorgo sobre diferentes tratamentos. A expressão genica é representada pela razão (expressão relativa) dos valores absolutos de cada gene comparados com os valores de expressão no tratamento controle normalizados pelos genes do RNA ribossomal *18S* e pelo gene Fator de Iniciação em Eucarióticos 4A-1 *EIF4a* (*Eukaryotic Iniciation Factor 4A-1*).

Genes Tratamentos	<i>SHR</i>		<i>PHB</i>		<i>PHV</i>		<i>REV</i>	
	Expressão relativa	<i>P</i>	Expressão relativa	<i>P</i>	Expressão relativa	<i>P</i>	Expressão relativa	<i>P</i>
Manitol – tratadas	3,026 ^c	0,013	5,349 ^c	0,002	0,950 ^a	0,745	0,440 ^a	0,064
Manitol – vizinhas	9,042 ^c	0,002	2,691 ^c	0,002	1,122 ^a	0,608	0,584 ^a	0,301
Glifosato – tratadas	11,883 ^c	0,002	10,074 ^c	0,002	1,777 ^c	0,04	5,928 ^c	0,001
Glifosato - vizinhas	8,866 ^c	0,002	2,237 ^c	0,028	1,298 ^a	0,343	1,721 ^a	0,185
Ext. Copaíba - tratadas	12,921 ^c	0,002	9,481 ^c	0,002	1,292 ^a	0,379	2,095 ^a	0,064
Ext. Copaíba - vizinhas	3,947 ^c	0,013	0,816 ^a	0,413	0,551 ^b	0,001	0,990 ^a	0,963
IBA – tratadas	1,580 ^a	0,280	0,925 ^a	0,802	1,256 ^a	0,525	0,711 ^a	0,376
IBA - vizinhas	1,460 ^a	0,336	0,686 ^a	0,189	1,388 ^a	0,388	1,278 ^a	0,396
Rutina – tratadas	1,326 ^a	0,745	0,975 ^a	0,929	1,065 ^a	0,766	0,883 ^a	0,732
Rutina – vizinhas	2,134 ^a	0,101	2,009 ^a	0,064	1,640 ^a	0,055	2,324 ^a	0,051

^a Não diferem do controle.

^b Indica baixa regulação significativa.

^c Indica alta regulação significativa.

8. DISCUSSÃO

8.1 A deficiência hídrica e a comunicação radicular

Plantas vizinhas ao tratamento com manitol apresentaram redução da ETR, porém não ocasionou alteração na taxa de assimilação de CO₂ observada em plantas tratadas, indicando que a redução da ETR possa estar relacionada a fotoinibição dinâmica. A deficiência hídrica ocasionada pela desidratação osmótica do tratamento com manitol levou a redução do CRA, e essa alteração foi sinalizada para plantas vizinhas que também apresentaram redução. Apesar de não apresentar aumento significativo no extravasamento de eletrólitos, não indicando danos em membranas, observamos aumento na atividade da enzima peroxidase em raízes tratadas e vizinhas, o que pode ser indicativo de defesa contra estresse oxidativo (MELONI et al., 2003). O aumento na expressão do gene *SHR*, correlacionado com a redução do desenvolvimento radicular pode estar associado ao espessamento de parede celular, característica comum em plantas com baixa disponibilidade hídrica, e que segundo Kudo et al. (2016), ocorre devido a regulação da via de fatores de transcrição *DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING 1A (DREB1A)*, genes que demonstram características de aumentar a tolerância ao estresse por seca em várias culturas.

A redução observada no comprimento radicular e da parte aérea das plantas tratadas e em plantas vizinhas se relaciona com o menor turgor celular, importante para divisão e alongamento celular (BETH KIRKHAM; GARDNER; GERLOFF, 1972; HARB et al., 2010). Além disso, quando ocorre o espessamento de parede celular, é formada uma barreira física que associada a alteração do balanço de hormônios como ácido abscísico (ABA) e giberelinas, inibem mecanismos de alongamento e não ocorre a divisão celular (BUCHANAN et al., 2005). As respostas induzidas pela sinalização de deficiência hídrica levam também a produção diferencial de grande variedade de biomoléculas relacionadas a tolerância (RNA, proteínas, poliaminas e enzimas), porém em plantas que apresentam essa alteração é

observada a redução da altura e produção de massa seca (KANG et al., 2016; RAO; CHAITANYA, 2016). Portanto, as alterações observadas nas plantas vizinhas correlacionadas com plantas sobre deficiência hídrica, indicam que houve sinalização, levando a redução no desenvolvimento, sendo a redução característica da ativação de mecanismo de tolerância a deficiência hídrica.

8.2. Ação herbicida induz a sinalização e comunicação

O tratamento com glifosato induz a redução do desenvolvimento de raiz e a sinalização provocado por esse tratamento também reduziu este parâmetro nas plantas vizinhas e também afetou a atividade de peroxidase em raízes e folhas dessas plantas. O efeito herbicida do glifosato é altamente danoso ao vegetal, pois atinge a via do ácido chiquímico, inibindo a síntese de aminoácidos essenciais e compostos fenólicos (MAEDA; DUDAREVA, 2012). Os aminoácidos são importantes na formação de moléculas proteicas, que apresentam função estrutural e/ou sinalizadora (GILROY et al., 2016). Substâncias da classe dos compostos fenólicos tem funções importantes no metabolismo antioxidante, pois apresentam hidroxilas e atuam como agentes redutores e doadores de hidrogênio (MANQUIAN-CERDA et al., 2016). Esta alteração, pode indicar que este tratamento levou a alterações do metabolismo oxidativo tanto em folhas quanto em raízes de sorgo, ocasionando comunicação para as plantas vizinhas que também apresentaram as mesmas respostas, caracterizando a sinalização para prevenção contra as moléculas de glifosato. Observamos também, a redução da condutância estomática e conseqüentemente a redução da assimilação de CO₂, que pode ser uma resposta associada a redução da absorção de água pelas raízes

O glifosato também causou aumento da expressão do gene *SHR*, nas plantas tratadas, indicando diferenciação dos tecidos radiculares, que podem aumentar as barreiras de entrada de moléculas de glifosato, pois o balanço com genes da família *KANADI* podem levar a diferenciação de células da endoderme (CARLSBECKER et al., 2010) com parede celular

mais espessada (FRANCO et al., 2015b). Ainda, o aumento da expressão dos genes *PHB*, *PHV* e *REV*, são relacionados ao desenvolvimento lateral e células de tecido vascular, e podem levar ao desenvolvimento lateral de tecidos radiculares, comportamento comum em situação de estresse (HAO et al., 2011). Observamos ainda, o aumento da expressão de *SHR* e *PHB* em plantas vizinhas, indicando estratégia semelhante a observada nas plantas tratadas e evidenciando que este tratamento induziu a comunicação entre raízes levando a expressão diferenciada desses genes. Portanto, a comunicação induzida por glifosato levou a respostas que aumentaram a atividade da enzima peroxidase, dos genes *SHR* e *PHB* e diminuíram a condutância estomática, o que pode reduzir o transporte de água e solutos por fluxo de massa, caracterizando um mecanismo para evitar o estresse. Por apresentar efeito direto em células meristemáticas o glifosato inibe o desenvolvimento da planta e segundo Vaughn e Duke (1986), as raízes de plantas de soja tratadas com glifosato apresentaram menor atividade mitótica, menor turgor celular e perda de microtúbulos na região de divisão no ápice radicular.

Por fim, o aumento da atividade da peroxidase nas plantas vizinhas é indicativo de antecipação de respostas contra o estresse oxidativo, e o aumento da expressão de *SHR* e *PHB* indicam estímulo para retomada de diferenciação do periciclo e desenvolvimento lateral de raízes, como mecanismo evitar o possível contato com o glifosato.

8.3 Efeito da alelopatia na comunicação de raízes

Os efeitos provocados pelo extrato de copaíba induzem a atividade alelopática e levam a redução do desenvolvimento radicular das plantas tratadas e vizinhas. A sinalização também alterou o desenvolvimento da parte aérea das plantas vizinhas. Segundo Franco et al. (2016) esse efeito ocorre pela presença dos flavonoides glicosilados quercetina-3-*O*- α -*rhamnoside* e *kaempferol-3-O- α -rhamnoside*, que afetam a raiz, mas ao serem transportados para a parte

aérea, podem não apresentar efeito ou estimular o comprimento em baixa doses. Souza Filho et al. (2010) também observaram esses efeitos inibitórios ao crescimento ao estudarem os efeitos de extratos brutos de outras espécies de *Copaifera*, entre elas *C. duckei*, *C. martii*, *C. reticulata*. Além disso, a redução encontrada na parte aérea de plantas vizinhas, indica que comunicação da planta tratada sinalizando para a vizinha, levando ao menor desenvolvimento em função de desvio energético para produção de moléculas de resistência a deficiência hídrica nas plantas vizinhas (GAGNÉ-BOURQUE et al., 2016). Segundo FRANCO et al. (2015b) isso está relacionado, principalmente, com alterações no padrão de expressão do gene *SHR*, alterando seu balanço com o gene *SCR*, e a caracterização das células de córtex e endoderme.

O tratamento com rutina provocou a redução do desenvolvimento de raiz sinalizando também para a redução em menor escala nas plantas vizinhas. Enquanto o desenvolvimento da parte aérea não é alterado em plantas tratadas, porém, a sinalização estimula o desenvolvimento da parte aérea em plantas vizinhas. A redução na condutância estomática nas plantas tratadas mostra correlação com a redução do conteúdo relativo de água, o que não é observado nas plantas vizinhas, e permite a recuperação da condutância estomática. Portanto, o menor desenvolvimento das plantas tratadas, comparado ao das plantas vizinhas, pode ser relacionado a menor condutância estomática, que leva a redução na assimilação de CO₂. Segundo Zhou e Yu, (2006) substâncias com potencial alelopático podem alterar diretamente ou indiretamente a fotossíntese, sendo que em alguns casos a ação indireta afeta a absorção e o conteúdo de água na planta.

Este tratamento e a sinalização causada por ele, não alteraram os índices de fluorescência da clorofila *a*, a atividade de enzimas antioxidantes e tampouco a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento de tecidos radiculares. Deste modo, apresenta capacidade de sinalização levando a comunicação por raízes, porém, não provoca atividade

estressante. Um tipo de sinalização por flavonoides é observada quando ocorre exsudação de flavonoides no solo, que possui importante papel para o desenvolvimento de micorrizas em associação com as raízes, sendo essas associações, estimuladas em casos de infecções, pois auxiliam na resistência contra patógenos (EKE et al., 2016). Por isso pode ser interpretada pela planta vizinha com sinalização de defesa e causa a redução nos parâmetros de desenvolvimento. A diferença da atividade encontrada, relacionada ao extrato de copaíba, pode ter relação com a composição de glicosídeos deste flavonoide e a mistura de substâncias presente no extrato, o que pode alterar a dinâmica de absorção e seu mecanismo de ação. Deste modo, as moléculas de rutina passam a ter uma atividade semelhante ao do regulador vegetal IBA (KRISHNAMURTHY; RATHINASABAPATHI, 2013; FRANCO et al., 2015b). Segundo Peer e Murphy (2007), isso ocorre, pois os flavonoides podem atuar na modulação do transporte de auxina, levando a retroalimentação de sinalização de estresse.

Portanto, observamos que o extrato vegetal rico em flavonoides apresenta atividade distinta da apresentada por um flavonoide isolado. Em mistura complexa com outros compostos presentes no extrato vegetal, apresentam atividade inibitória que afeta o desenvolvimento de raiz, assimilação de CO₂, ETR e expressão diferencial dos genes, induzindo sinalização para plantas vizinhas que também apresentam alterações nesses parâmetros. Já o flavonoide isolado apresenta atividade de regulador vegetal.

8.4. *Ácido indol-3-butírico (IBA) e suas implicações comunicação radicular*

No tratamento com IBA observamos a redução no desenvolvimento radicular e sinalização levando a redução desse parâmetro também em plantas vizinhas. Apesar da redução no desenvolvimento radicular, em plantas vizinhas a sinalização leva ao aumento no desenvolvimento de parte aérea. A distribuição irregular de auxinas leva ao crescimento diferencial da planta e a aplicação de auxinas pode induzir o crescimento lateral em

detrimento do crescimento apical (ARMENGOT; MARQUÈS-BUENO; JAILLAIS, 2016; RAKUSOVÁ et al., 2016). A redução na condutância estomática no terceiro dia após aplicação do tratamento seguida de recuperação nos dias posteriores não prejudicial ao vegetal, pois a taxa de assimilação de CO₂ apresentou aumento em plantas tratadas e em plantas vizinhas. Além da função direta da auxina no desenvolvimento vegetal, respostas dependentes estão relacionadas à diferentes tipos de estresses, onde o aumento da produção de auxina estimula mecanismos fisiológicos como a abertura dos estômatos, produção e ativação de aquaporinas e o posicionamento lateral das raízes, e ainda a inibição do desenvolvimento é outra resposta dependente de auxina (NASER; SHANI, 2016). E pode ser correlacionado ao aumento no conteúdo relativo de água induzida neste tratamento. Porém, o tratamento não causou alterações em nenhum outro parâmetro avaliado. Deste modo, apresenta capacidade de induzir comunicação em vegetais, apesar de não exibir potencial estressante. Segundo Krishnamurthy e Rathinasabapathi (2013) isso pode ocorrer devido a importância da auxina para a sinalização de genes responsivos ao estresse dependentes de auxina, e sua ausência pode ter impacto negativo, principalmente por suprimir a expressão de genes de sinalização para produção e ativação de enzimas antioxidantes. Portanto, esta substância intrínseca ao metabolismo vegetal pode desencadear respostas que induzem sinalização para plantas vizinhas.

8.5. Implicações dos diferentes mecanismos indutores na comunicação entre raízes

Para que ocorra a comunicação radicular de uma planta com a outra é necessário que uma delas receba um estímulo externo, como apresentamos aqui, a aplicação de substâncias de natureza e atividades distintas. Substâncias com atividade características vão induzir o vegetal a produzir respostas que podem alterar diferentes vias moleculares e fisiológicas no vegetal e estimular a produção de sinalizadores para a planta vizinha que não foi afetada

diretamente por aquela substância. Porém, ao receber a sinalização da planta afetada, a planta vizinha também pode apresentar alteração em diferentes parâmetros fisiológicos, anatômicos, morfológicos e biomoleculares, e em um evento futuro semelhante ao experimentado pela planta vizinha podem responder com maior efetividade a esta adversidade. Observamos também, que ao perceberem efeitos de hormônios vegetais, as plantas também podem apresentar comunicação com plantas vizinhas e induzir alterações. Segundo Bais et al. (2004), as plantas possuem um sistema de comunicação subterrâneo que pode ocorrer de raiz - raiz e também de raiz - microorganismos – raiz, sendo este sistema importante para as populações vegetais na aquisição de água, nutrientes e espaço e apesar de sistema ser muitas vezes relacionado a competição entre espécies, pode ser um mecanismo útil na sinalização de perturbações bióticas e abióticas.

Os diferentes tipos sinalização podem provocar redução no comprimento radicular e de parte aérea de plantas vizinhas, semelhante ao efeito que ocorre nas plantas diretamente afetadas. Esse efeito quando provocado pela deficiência hídrica, ocorre pela redução do turgor celular, importante na divisão e alongamento celular (BETH KIRKHAM; GARDNER; GERLOFF, 1972; HARB et al., 2010). Esses efeitos podem ser comparados aos efeitos da ativação de vias de tolerância multi-estresse dependentes de auxina, onde o resultado final da ativação dessas respostas é a redução do desenvolvimento vegetal (NASER; SHANI, 2016), indicando que a sinalização pode induzir a respostas preventivas.

A redução encontrada na parte aérea de plantas vizinhas indica a comunicação da planta tratada sinalizando para a vizinha, levando ao menor desenvolvimento em função de desvio energético para produção de moléculas de resistência nas plantas vizinhas relacionado a respostas de deficiência hídrica (GAGNÉ-BOURQUE et al., 2016). As substâncias manitol, glifosato e extrato de copaíba (extrínsecas ao metabolismo vegetal) foram as únicas a afetar a expressão dos genes relacionados ao desenvolvimento radicular e a induzir sinalização

alterando esses parâmetros em plantas vizinhas. Essa associação, principalmente em relação ao padrão de expressão do gene *SHR* e alteração de seu balanço com o gene *SCR*, pode levar a diferenciação e caracterização das células de córtex e endoderme (HELARIUTTA et al., 2000; FRANCO et al., 2015b). Ainda, os tratamentos que alteram a expressão dos genes *SHR* e dos fatores de transcrição da família *HD-ZIP III*, podem levar ao menor crescimento radicular (FRANCO et al., 2015a, 2015b) em função do desenvolvimento lateral em resposta a atividade das substâncias.

Tanto a deficiência hídrica quanto o acúmulo de substâncias alelopáticas podem levar a produção de moléculas com alta capacidade oxidativa e quando atuam em membranas do aparato fotossintético podem ganhar elétrons que seria carreados na para as vias de produção de ATP e NADPH (ZHOU; YU, 2006; VANLERBERGHE; MARTYN; DAHAL, 2016). Em situações estressantes o metabolismo pode ser alterado em decorrência da produção de espécies reativas de oxigênio. Portanto, a produção de enzimas antioxidantes para resposta ao estresse é ativada, e com isto um dos efeitos observados será outra vez, a redução do crescimento vegetal (XIA et al., 2015), pois a energia necessária para o desenvolvimento é realocada para respostas ao estresse. No entanto, com as substâncias aplicadas, apenas o tratamento com glifosato e manitol apresentaram elevação da atividade específica de peroxidase. Porém isso não é indicativo de que os outros tratamentos não produziram EROs. Isso porque, em EROs podem ser eliminadas por antioxidantes não enzimáticos como α -tocoferol, β -caroteno, compostos fenólicos, ascorbato, glutatona (ARBONA et al., 2003). Portanto, o tratamento com manitol indica que a produção de antioxidantes enzimáticos foi necessária para suplementar os não enzimáticos. Já o tratamento com glifosato, a produção de POD, pode estar relacionada com a inibição da via dos compostos fenólicos, diminuindo a quantidade dessas substâncias que atuam como agentes redutores, sendo necessário a produção e ativação de antioxidantes enzimáticos (MANQUIAN-CERDA et al., 2016). Esse

resultado nos indica que a sinalização para produção e/ou ativação de enzimas antioxidantes, só ocorrerá quando a planta tratada também apresentar aumento nesse parâmetro.

Observamos que entre os tratamentos aplicados, ao dividi-los em intrínsecos (rutina e IBA) e extrínsecos (manitol, glifosato e extrato de copaíba) ao metabolismo vegetal, os extrínsecos induziram a expressão diferenciada da expressão dos genes analisados, enquanto os intrínsecos não alteraram a expressão dos genes. Ainda, é possível observar que as plantas vizinhas só apresentaram expressão diferenciada, quando as plantas tratadas também apresentaram esse comportamento. Portanto, a comunicação por raízes é uma importante via de sinalização, principalmente quando a alteração ambiental é induzida por agentes extrínsecos ao metabolismo vegetal. Isso evidencia uma importante via de sinalização, onde observamos alteração na expressão de genes, que podem induzir a alteração na produção de enzimas antioxidantes quando ocorre alteração no metabolismo oxidativo e alterações nos parâmetros fisiológicos e morfológicos. Esse comportamento pode ser associado a memória de estresse, onde a planta estressada em um primeiro evento pode sofrer alterações moleculares, bioquímicas e fisiológicas, resultando na redução do desenvolvimento vegetal, porém em um segundo evento de estresse, as alterações ocorrem de maneira distinta, resultando em tolerância ao estresse sem apresentar danos ao vegetal (CRISP et al., 2016). Nesse aspecto, a comunicação pode induzir respostas semelhantes a memória de estresse, porém sem que a planta receptora da sinalização precise passar por um evento anterior. O que podemos observar em relação a manutenção dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e da assimilação de CO₂. Uma vez que, apesar da redução de estatura, o rendimento energético não é afetado em plantas vizinhas que recebem a sinalização.

Devido à natureza sésil as plantas requerem adaptações específicas para responder ao ambiente e a capacidade de aprender com experiências prévias são importantes para otimizar a aptidão de aclimatação ao estresse ambiental (VAN LOON, 2016). A experiência prévia de

estresse ou a memória compartilhada através da comunicação entre plantas é um importante mecanismo de adaptação ao ambiente terrestre, é possibilitado devido a característica de alta variabilidade genética das populações resultado em maior plasticidade fenotípica (HUANG et al., 2016). Ainda, a comunicação da memória de estresse possui importância, visto que, na natureza nem todos os indivíduos da população serão expostos as alterações ambientais ao mesmo tempo, porém inter-relação entre eles pode levar a uma rede de respostas (GLEASON, 1926). Os estudos de memória do estresse em plantas indicam que os principais mecanismos para que isso ocorra estão associados aos fatores epigenéticos controlados pelo metabolismo de RNAs, silenciamento pós-transcricional de genes e a metilação de DNA dirigida por RNA levando a reprogramação do epigenoma e do transcriptoma e alterando a memória (CRISP et al., 2016; HUANG et al., 2016; VAN LOON, 2016). A capacidade de comunicação e memorização do estresse é considerada, portanto, comportamento de inteligência vegetal, ao ponto que garante a versatilidade para lidar com estresses abióticos equilibrando as respostas de defesa com o desenvolvimento (VAN LOON, 2016).

Portanto, a comunicação vegetal pela raiz pode ser caracterizada como um mecanismo ao nível de populações vegetais para tolerância a alterações ambientais (GROSS, 2016). A sinalização enviada de uma planta afetada por alterações abióticas para plantas vizinhas, antecipa respostas a diferentes tipos de sinalizações, sejam elas causadas por condições estressantes ou não, aumentando a probabilidade de sobrevivência em situações adversas. As respostas provocadas na planta vizinha em função da comunicação, afeta o desenvolvimento diminuindo os índices de crescimento, principalmente em raiz. Uma vez que, o gasto energético passa a ser focado na produção de moléculas para a tolerância a alteração ambiental (MUNNS, 1993; GROSS, 2016). Por este motivo, os índices fisiológicos relacionados a fotossíntese, não apresentam alterações nas plantas vizinhas.

Deste modo, podemos concluir que plantas de sorgo podem transmitir sinalização pela raiz para plantas vizinhas ao serem afetadas por deficiência hídrica, herbicida, aleloquímicos e reguladores (hormônios) vegetais. O efeito da transmissão de sinal na planta vizinha levou a redução do desenvolvimento de raízes e condutância estomática em função de todos os tratamentos empregados. O efeito causado por herbicida, deficiência hídrica e alelopatia, induziu a expressão diferenciada de genes do desenvolvimento de raiz. A sinalização por deficiência hídrica e alelopatia levou também alteração na ETR. Quanto à alteração da atividade de enzimas antioxidantes, apenas o tratamento com glifosato apresentou alteração de em folhas e raízes das plantas tratadas e das vizinhas. O tratamento com manitol apresentou alteração na atividade específica de POD apenas nas raízes tratadas e vizinhas. Apesar das peculiaridades de respostas ao tratamento e sinalização para plantas vizinhas, todas as plantas tratadas apresentarem alteração da taxa de assimilação de CO₂, porém a sinalização leva a manutenção desse parâmetro nas plantas vizinhas. Portanto, a comunicação radicular se caracteriza como um importante sistema de sinalização aos diferentes tipos de alterações abióticas e as plantas que recebem a sinalização podem antecipar respostas, aumentando as chances de tolerar essa alteração e podem evitar o estresse.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo testamos nossa hipótese observamos que:

- As plantas de sorgo ao serem afetadas com as diferentes substâncias aplicadas como tratamentos, transmitem sinal para as plantas vizinhas sinalizando sobre as condições em que se encontram expostas no ambiente.

- As plantas vizinhas ao receberem esse sinal podem antecipar respostas aumentando as chances de tolerância às alterações ambientais. Uma vez que, essas plantas, apresentam alterações na expressão dos genes do desenvolvimento de raiz, parâmetros de crescimento, condutância estomática e conteúdo de água, porém não apresentam alteração em parâmetros da fluorescência da clorofila a e na taxa de assimilação de CO₂.

10. REFERÊNCIAS

- AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. **Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance** *Plant Science*, 2012. .
- ALMANSOURI, M.; KINET, J. M.; LUTTS, S. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). **Plant and Soil**, v. 231, n. 2, p. 243–254, 2001.
- ALMEIDA, L. F. R. de; DELACHIAVE, M. E.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. dos; MANCINI, E.; FEO, V. De. In Vitro Allelopathic Potential of *Leonurus Sibiricus* L. Leaves. **Journal of Plant Interactions**, 4 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17429140701749906#.V0w0cb4QFaU>>. Acesso em: 30 maio. 2016.
- ARBONA, V.; FLORS, V.; JACAS, J.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; GÓMEZ-CADENAS, A. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. **Plant and cell physiology**, v. 44, n. 4, p. 388–394, 2003.
- ARIMURA, G.; KÖPKE, S.; KUNERT, M.; VOLPE, V.; DAVID, A.; BRAND, P.; DABROWSKA, P.; MAFFEI, M. E.; BOLAND, W. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves: IV. Diurnal and nocturnal damage differentially initiate plant volatile emission. **Plant physiology**, v. 146, n. 3, p. 965–73, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2259069&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29 maio. 2016.
- ARMENGOT, L.; MARQUÈS-BUENO, M. M.; JAILLAIS, Y. Regulation of polar auxin transport by protein and lipid kinases. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 14, p. 4015–4037, 2016.
- ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. D. L. E.; SCAPIM, C. A.; FAGLIARI, J. R.; SANTOS, J. L. DOS. Influência Do Estresse Hídrico Simulado Com Manitol Na Germinação De Sementes E Crescimento De Plântulas De Canola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 98–106, 2007.
- BAIS, H. P.; PARK, S. W.; WEIR, T. L.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 1, p. 26–32, 2004.
- BAIS, H. P.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. Allelopathy and Exotic Plant Invasion: From Molecules and Genes to Species Interactions. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5638, p. 1377–80, 5 set. 2003. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/301/5638/1377.abstract>>. Acesso em: 21 abr. 2016.
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 233–266, 2006. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>>.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual review of plant biology**, v. 59, p. 89–113, 2008.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1971.

BELZ, R. G. Allelopathy in crop/weed interactions--an update. **Pest management science**, v. 63, n. 4, p. 308–26, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195966>>. Acesso em: 1 maio. 2016.

BENFEY, P. N.; LINSTEAD, P. J.; ROBERTS, K.; SCHIEFELBEIN, J. W.; HAUSER, M.-T.; AESCHBACHER, R. A. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. **Development**, v. 119, p. 57–70, 1993. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/content/abstract/119/1/57>>.

BETH KIRKHAM, M.; GARDNER, W. R.; GERLOFF, G. C. Regulation of cell division and cell enlargement by turgor pressure. **Plant physiology**, v. 49, n. 6, p. 961–962, 1972.

BHATTACHARJEE, S. **Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants** *Current Science*, 2005. .

BHATTACHARJEE, S. The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–22, 2012.

BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v. 170, n. 4, p. 489–504, abr. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24233012>>. Acesso em: 30 maio. 2016.

BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, v. 164, n. 1, p. 77–84, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945202003382>>. Acesso em: 24 mar. 2016.

BOYER, J. S. Measurement of the Water Status of Plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 20, n. 1, p. 351–364, 1969. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.20.060169.002031%5Cnhttp://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.pp.20.060169.002031>>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAZMA, A.; HINGAMP, P.; QUACKENBUSH, J.; SHERLOCK, G.; SPELLMAN, P.; STOECKERT, C.; AACH, J.; ANSORGE, W.; BALL, C. A.; CAUSTON, H. C.; GAASTERLAND, T.; GLENISSON, P.; HOLSTEGE, F. C.; KIM, I. F.; MARKOWITZ, V.; MATESE, J. C.; PARKINSON, H.; ROBINSON, A.; SARKANS, U.; SCHULZE-KREMER, S.; STEWART, J.; TAYLOR, R.; VILO, J.; VINGRON, M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. **Nature genetics**, v. 29, n. 4, p. 365–71, dez. 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng1201-365>>. Acesso em: 24 mar. 2016.

BUCHANAN, C. D.; LIM, S.; SALZMAN, R. A.; KAGIAMPAKIS, I.; MORISHIGE, D. T.; WEERS, B. D.; KLEIN, R. R.; PRATT, L. H.; CORDONNIER-PRATT, M. M.; KLEIN, P. E.; MULLET, J. E. Sorghum bicolor's transcriptome response to dehydration, high salinity and ABA. **Plant Molecular Biology**, v. 58, n. 5, p. 699–720, 2005.

BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: New roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 1, p. 98–111, 2010.

BUSTIN, S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23–39, 1 ago. 2002. Disponível em: <<http://jme.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1677/jme.0.0290023>>.

CALATAYUD, A.; BARRENO, E. Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. **Environmental Pollution**, v. 115, n. 2, p. 283–289, dez. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749101001014>>. Acesso em: 31 maio. 2016.

CARLSBECKER, A.; LEE, J.-Y.; ROBERTS, C. J.; DETTMER, J.; LEHESRANTA, S.; ZHOU, J.; LINDGREN, O.; MORENO-RISUENO, M. A.; VATÉN, A.; THITAMADEE, S.; CAMPILHO, A.; SEBASTIAN, J.; BOWMAN, J. L.; HELARIUTTA, Y.; BENFEY, P. N. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 316–321, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature08977>>.

CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, v. 89, n. SPEC. ISS., p. 907–916, 2002.

CHEONG, Y. H.; CHANG, H.-S.; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T.; LUAN, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 129, n. 2, p. 661–677, 2002.

CORNIC, G. Drought Stress Inhibits Photosynthesis by Decreasing Stomatal Aperture – Not by Affecting ATP Synthesis. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 5, p. 187–188, 1 maio 2000. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1360138500016253/fulltext>>. Acesso em: 10 maio. 2016.

CRISP, P. A.; GANGULY, D.; EICHTEN, S. R.; BOREVITZ, J. O.; POGSON, B. J. Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. **Science Advances**, v. 2, n. 2, p. e1501340–e1501340, 2016. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4788475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CZARNOTA, M. A.; RIMANDO, A. M.; WESTON, L. A. Evaluation of Root Exudates of Seven Sorghum Accessions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 9, p. 2073–2083, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A%253A1025634402071>>. Acesso em: 31 maio. 2016.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M. K.; SCHEIBLE, W.-R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 139, n. 1, p. 5–17, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1203353&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVÁ, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses.

Cellular and molecular life sciences : CMLS, v. 57, n. 5, p. 779–795, 2000.

DAVIS, D. G.; SWANSON, H. R. Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, n. 2, p. 95–108, 2001.

DE MARTINO, L.; MENCHERINI, T.; MANCINI, E.; AQUINO, R. P.; DE ALMEIDA, L. F. R.; DE FEO, V. In Vitro phytotoxicity and antioxidant activity of selected flavonoids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 5406–5419, 2012.

DEPUYDT, S.; HARDTKE, C. S. **Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation** **Current Biology**, 2011. .

DI LAURENZIO, L.; WYSOCKA-DILLER, J.; MALAMY, J. E.; PYSH, L.; HELARIUTTA, Y.; FRESHOUR, G.; HAHN, M. G.; FELDMANN, K. A.; BENFEY, P. N. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 423–433, 1996.

DODD, G. L.; DONOVAN, L. A. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 8, p. 1146–1153, 1999.

DUKE, S. Secondary effects of glyphosate on plants. **Book Chapter**, p. 87–96, 2016.

DUKE, S. O.; SCHEFFLER, B. E.; DAYAN, F. E.; WESTON, L. A.; OTA, E. Strategies for using transgenes to produce allelopathic crops. **Weed Technology**, v. 15, n. 4, p. 826–834, 2001. Disponível em: <<http://wssa.allenpress.com/pdfserv/i0890-037X-015-04-0826.pdf>>.

EINHELLIG, F. A.; RASMUSSEN, J. A.; HEJL, A. M.; SOUZA, I. F. Effects of root exudate sorgoleone on photosynthesis. **Journal of chemical ecology**, v. 19, n. 2, p. 369–75, mar. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24248881>>. Acesso em: 31 maio. 2016.

EKE, P.; CHATUE, G. C.; WAKAM, L. N.; KOUIPOU, R. M. T.; FOKOU, P. V. T.; BOYOM, F. F. Mycorrhiza consortia suppress the fusarium root rot (*Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biological Control**, v. 103, p. 240–250, 2016.

ELSHEERY, N. I.; CAO, K. F. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 6, p. 769–777, 2008.

EMERY, J. F.; FLOYD, S. K.; ALVAREZ, J.; ESHED, Y.; HAWKER, N. P.; IZHAKI, A.; BAUM, S. F.; BOWMAN, J. L. Radial Patterning of Arabidopsis Shoots by Class III HD-ZIP and KANADI Genes. **Current Biology**, v. 13, n. 20, p. 1768–1774, 2003.

ENNAHLI, S.; EARL, H. J. Physiological limitations to photosynthetic carbon assimilation in cotton under water stress. **Crop Science**, v. 45, n. 6, p. 2374–2382, 2005.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A. A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J. A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC plant biology**, v. 8, p. 131, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2629474&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia.

Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v. 12, n. Edição especial, p. 175–204, 2000. Disponível em: <<http://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/Gui-y-Alvez-1999.pdf>>.

FRANCO, D. M.; SALDANHA, L. L.; NETO, J. de S. L.; SANTOS, L. C. dos; DOKKEDAL, A. L.; ALMEIDA, L. F. R. de. Seasonal variation in allelopathic potential of the leaves of *Copaifera langsdorffii* Desf. **Acta Botanica Brasilica**, n. ahead, p. 0–0, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062016005001102&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

FRANCO, D. M.; SALDANHA, L. L.; SILVA, E. M.; SANTOS, C.; ALMEIDA, L. F. R. D. E.; PAULO, S. Effects of leaf extracts of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.: on growth and gene expression during root development of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Allelopathy Journal**, v. 35, n. 2, p. 237–248, 2015a.

FRANCO, D. M.; SILVA, E. M.; SALDANHA, L. L.; ADACHI, S. A.; SCHLEY, T. R.; RODRIGUES, T. M.; DOKKEDAL, A. L.; NOGUEIRA, F. T. S.; ROLIM DE ALMEIDA, L. F. Flavonoids modify root growth and modulate expression of SHORT-ROOT and HD-ZIP III. **Journal of Plant Physiology**, v. 188, p. 89–95, 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2015.09.009>>.

GAGNÉ-BOURQUE, F.; BERTRAND, A.; CLAESSENS, A.; ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. Alleviation of Drought Stress and Metabolic Changes in Timothy (*Phleum pratense* L.) Colonized with *Bacillus subtilis* B26. v. 7, n. May, p. 1–16, 2016.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J.-F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 37, n. 3, p. 263–285, 2002.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.-M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 990, n. 1, p. 87–92, 1989. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)>.

GHANASHYAM, C.; JAIN, M. Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 9, p. 846–848, 2009.

GILROY, S.; BIAŁASEK, M.; SUZUKI, N.; GÓRECKA, M.; DEVIREDDY, A. R.; KARPINSKI, S.; MITTLER, R. ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. **Plant physiology**, v. 171, n. 3, p. 1606–1615, 2016.

GIMENEZ, C.; GALLARDO, M.; THOMPSON, R. B. Plant – Water Relations. p. 231–238, 2005.

GLEASON, H. A. The individualistic concept of the plant association. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, p. 7–26, 1926.

GNIĄZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 3B, p. 395–407, 2005.

GREEN, T. G. A.; SCHROETER, B.; KAPPEN, L.; SEPPELT, R. D.; MASEYK, K. An assessment of the relationship between chlorophyll a fluorescence and CO₂ gas exchange from field measurements on a moss and lichen. **Planta**, v. 206, n. 4, p. 611–618, 7 out. 1998. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s004250050439>>. Acesso em: 30 maio. 2016.

- GROSS, M. Could plants have cognitive abilities? **Current Biology**, v. 26, n. 5, p. R181–R184, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982216301269>>. Acesso em: 8 mar. 2016.
- HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters and regulatory factors. **Plant Molecular Biology**, v. 49, n. 3–4, p. 373–385, 2002.
- HAKALA, M.; TUOMINEN, I.; KERÄNEN, M.; TYYSTJÄRVI, T.; TYYSTJÄRVI, E. Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1706, n. 1–2, p. 68–80, 2005.
- HAO, Y.; WEI, W.; SONG, Q.; CHEN, H.; ZHANG, Y.; WANG, F.; ZOU, H.; LEI, G.; TIAN, A.; ZHANG, W. Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. **The Plant Journal**, v. 68, n. 2, p. 302–313, 2011.
- HARB, A.; KRISHNAN, A.; AMBAVARAM, M. M. R.; PEREIRA, A. Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. **Plant physiology**, v. 154, n. 3, p. 1254–1271, 2010.
- HAWKER, N. P.; BOWMAN, J. L. Roles for Class III HD-Zip and KANADI genes in Arabidopsis root development. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 2261–2270, 2004.
- HELARIUTTA, Y.; FUKAKI, H.; WYSOCKA-DILLER, J.; NAKAJIMA, K.; JUNG, J.; SENA, G.; HAUSER, M. T.; BENFEY, P. N. The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 555–567, 2000. Disponível em: <[http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10850497&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1016/S0092-8674\(00\)80865-X](http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10850497&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1016/S0092-8674(00)80865-X)>.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, n. 347, p. 1–32, 1950. Disponível em: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19500302257.html>>.
- HOAGLAND, R. E.; WILLIAMS, R. D. Bioassays - useful tools for the study of allelopathy. In: Section Title: Biochemical Methods, **Anais...**2004.
- HUANG, L.; RAATS, D.; SELA, H.; KLYMIUK, V.; LIDZBARSKY, G.; FENG, L.; KRUGMAN, T.; FAHIMA, T. Evolution and Adaptation of Wild Emmer Wheat Populations to Biotic and Abiotic Stresses. **Annual review of phytopathology**, v. 54, p. 279–301, 2016.
- HUNG, K. T.; KAO, C. H. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. **Journal of plant physiology**, v. 160, p. 871–879, 2003.
- INDERJIT; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. Can plant biochemistry contribute to understanding of invasion ecology? **Trends in plant science**, v. 11, n. 12, p. 574–80, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138506002792>>. Acesso em: 29 maio. 2016.
- JUAREZ, M. T.; KUI, J. S.; THOMAS, J.; HELLER, B. A.; TIMMERMANS, M. C. P. microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. **Nature**, v. 428, n. 6978, p. 84–8, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999285>>.

KANG, J.; LONG, R.; CUI, Y.; ZHANG, T.; XIONG, J.; YANG, Q.; YAN, S. U. N. Proteomic analysis of salt and osmotic-drought stress in alfalfa seedlings. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 10, p. 2266–2278, 2016.

KLEIN, T. The variability of stomatal sensitivity to leaf water potential across tree species indicates a continuum between isohydric and anisohydric behaviours. **Functional Ecology**, v. 28, n. 6, p. 1313–1320, 2014.

KRISHNAMURTHY, A.; RATHINASABAPATHI, B. Auxin and its transport play a role in plant tolerance to arsenite-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, cell & environment**, v. 36, n. 10, p. 1838–49, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23489261>>. Acesso em: 23 maio. 2016.

KUDO, M.; KIDOKORO, S.; YOSHIDA, T.; MIZOI, J.; TODAKA, D.; FERNIE, A. R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Double overexpression of DREB and PIF transcription factors improves drought stress tolerance and cell elongation in transgenic plants. **Plant Biotechnology Journal**, 2016.

KUDOYAROVA, G. R.; KHOLODOVA, V. P.; VESELOV, D. S. Current state of the problem of water relations in plants under water deficit. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 60, n. 2, p. 165–175, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1021443713020143>>.

LI, Q.-M.; LIU, B.-B.; WU, Y.; ZOU, Z.-R. Interactive effects of drought stresses and elevated CO₂ concentration on photochemistry efficiency of cucumber seedlings. **Journal of integrative plant biology**, v. 50, n. 10, p. 1307–17, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19017118>>. Acesso em: 30 maio. 2016.

LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 2/3, p. 219–230, 2000. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1010746806891>>.

MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G.; TORRES, A.; VARELA, R. M.; CASTELLANO, D. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 683–687, jun. 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942297000113>>.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 73–105, 2012. Disponível em: <www.annualreviews.org>.

MANQUIAN-CERDA, K.; ESCUDEY, M.; ZUNIGA, G.; ARANCIBIA-MIRANDA, N.; MOLINA, M.; CRUCES, E. Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown in vitro. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 316–326, 2016.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.

MELONI, D. A.; OLIVA, M. A.; MARTINEZ, C. A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, n. 1, p. 69–76, 2003.

MUNNS, R. **Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses** *Plant, Cell & Environment*, 1993. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00840.x>>.

NADIN, M. (ed.). **Anticipation across disciplines**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 29

NAKAJIMA, K.; SENA, G.; NAWY, T.; BENFEY, P. N. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. **Nature**, v. 413, n. 6853, p. 307–311, 2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/35095061%5Cpapers3://publication/doi/10.1038/35095061>>.

NASER, V.; SHANI, E. Auxin response under osmotic stress. **Plant Molecular Biology**, v. 91, n. 6, p. 661–672, 2016.

NATHAN, J.; OSEM, Y.; SHACHAK, M.; MERON, E. Linking functional diversity to resource availability and disturbance: a mechanistic approach for water limited plant communities. **Journal of Ecology**, v. 104, n. 2, p. n/a-n/a, 17 dez. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1365-2745.12525>>. Acesso em: 16 dez. 2015.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; MURATA, N. **A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II** *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 2006. .

NOBEL, P. S. **Biophysical plant physiology and ecology**. San Francisco: W. H. Freeman, 1983.

NOGUEIRA, F. T. S.; MADI, S.; CHITWOOD, D. H.; JUAREZ, M. T.; TIMMERMANS, M. C. P. Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. **Genes and Development**, v. 21, n. 7, p. 750–755, 2007.

OHNISHI, N.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; TAKAHASHI, S.; HIGASHI, S.; WATANABE, M.; NISHIYAMA, Y.; MURATA, N. Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: Step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. **Biochemistry**, v. 44, n. 23, p. 8494–8499, 2005.

OTEIZA, P. I.; ERLEJMAN, A. G.; VERSTRAETEN, S. V.; KEEN, C. L.; FRAGA, C. G. Flavonoid-membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface? **Clinical and Developmental Immunology**, v. 12, n. 1, p. 19–25, 2005. Disponível em: <<http://journalsonline.tandf.co.uk/>>.

OTSUGA, D.; DEGUZMAN, B.; PRIGGE, M. J.; DREWS, G. N.; CLARK, S. E. REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. **Plant Journal**, v. 25, n. 2, p. 223–236, 2001.

PEER, W. A.; MURPHY, A. S. **Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators?** *Trends in Plant Science*, 2007. .

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–45, 1 maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>>.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36–e36, 2002.

PIOTROWICZ-CIESLAK, A. I.; ADOMAS, B.; MICHALCZYK, D. J. Different glyphosate

phytotoxicity of seeds and seedlings of selected plant species. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 19, n. 1, p. 123–129, 2010.

PRATES, H. T.; PAES, J. M. V.; PIRES, N. D. M.; PEREIRA FILHO, I. A.; MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 909–914, maio 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2000000500007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 30 maio. 2016.

RAKUSOVÁ, H.; ABBAS, M.; HAN, H.; SONG, S.; ROBERT, H. S.; FRIML, J. Termination of Shoot Gravitropic Responses by Auxin Feedback on PIN3 Polarity. **Current Biology**, v. 26, n. 22, p. 3026–3032, 2016.

RAO, D. E.; CHAITANYA, K. V. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in deciphering drought stress tolerance of crop plants. **Biologia Plantarum**, v. 60, n. 2, p. 201–218, 2016.

REBRIKOV, D. V.; TROFIMOV, D. Y. Real-time PCR: A review of approaches to data analysis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 455–463, 2006.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2nd. ed. Orlando, Florida: Academic Press, 1984.

RICE – EVANS, C. A.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. 1st. ed. New York: Marcel Dekker, 1998.

RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. **Allelopathy: basic and applied aspects**. London: Chapman and Hall, 1992.

SCHERES, B.; DILAURENZIO, L.; WILLEMSSEN, V.; HAUSER, M. T.; JANMAAT, K.; WEISBEEK, P.; BENFEY, P. N. Mutations affecting the radial organisation of the Arabidopsis root display specific defects throughout the embryonic axis. **Development**, v. 121, n. 1, p. 53–62, 1995. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/content/abstract/121/1/53>>.

SCHIEFELBEIN, J. W.; MASUCCI, J. D.; WANG, H. Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. **The Plant cell**, v. 9, n. 7, p. 1089–1098, 1997.

SILVESTRE, W. V. D.; SILVA, P. A.; PALHETA, L. F.; DE OLIVEIRA NETO, C. F.; DE MELO SOUZA, R. O. R.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; PINHEIRO, H. A. Differential tolerance to water deficit in two açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) plant materials. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 1, p. 4, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11738-016-2301-9>>.

SINCLAIR, T. R.; LUDLOW, M. M. Who Taught Plants Thermodynamics? The Unfulfilled Potential of Plant Water Potential. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 12, n. 3, p. 213–217, 1985.

SISA, M.; BONNET, S. L.; FERREIRA, D.; VAN DER WESTHUIZEN, J. H. **Photochemistry of flavonoids** *Molecules*, 2010. .

SLAVIK, B. **Methods of studying plant water relations**. Prague: Academia, 1974.

SMART, R. E.; BINGHAM, G. E. Rapid Estimates of Relative Water Content. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 53, n. 2, p. 258–260, 1 fev. 1974. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.53.2.258>>.

SOUZA FILHO, A. P. S.; GURGEL, E. S. C.; QUEIROZ, M. S. M.; SANTOS, J. U. M. Allelopathic Activity of Crude Extracts from Three Species of Copaifera (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Planta Daninha**, v. 28, p. 743–751, 2010.

STEINRÜCKEN, H. C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 94, n. 4, p. 1207–1212, jun. 1980. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X80905471>>. Acesso em: 8 fev. 2015.

SUZUKI, N.; KOUSSEVITZKY, S.; MITTLER, R.; MILLER, G. **ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress***Plant, Cell and Environment*, 2012. .

TARDIEU, F.; SIMONNEAU, T. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. Special, p. 419–432, 1998. Disponível em: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/49/Special_Issue/419.abstract>.

TAYLOR, L. P.; GROTEWOLD, E. **Flavonoids as developmental regulators***Current Opinion in Plant Biology*, 2005. .

TOLEDO, G. R. A. **Trasmissão de sinal de falta de água entre plantas: efeitos sobre a temperatura e a pressão de turgor foliar**. 2015. Universidade do Oeste Paulista, 2015.

TU, M.; HURD, C.; ROBISON, R.; RANDALL, J. M. Glyphosate. **Weed Control Methods Handbook**, p. 1–10, 2000.

VAN DAM, N. M.; BOUWMEESTER, H. J. Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication. **Trends in plant science**, v. 21, n. 3, p. 256–265, 29 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138516000091>>. Acesso em: 3 fev. 2016.

VAN LOON, L. C. The intelligent behavior of plants. **Trends in plant science**, v. 21, n. 4, p. 286–294, 2016.

VANLERBERGHE, G. C.; MARTYN, G. D.; DAHAL, K. Alternative oxidase: a respiratory electron transport chain pathway essential for maintaining photosynthetic performance during drought stress. **Physiologia plantarum**, v. 157, n. 3, p. 322–337, 2016.

VAUGHN, K. C.; DUKE, S. O. Ultrastructural effects of glyphosate on Glycine max seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 26, n. 1, p. 56–65, 1986.

VAZ, M.; PEREIRA, J. S.; GAZARINI, L. C.; DAVID, T. S.; DAVID, J. S.; RODRIGUES, A.; MAROCO, J.; CHAVES, M. M. Drought-induced photosynthetic inhibition and autumn recovery in two Mediterranean oak species (*Quercus ilex* and *Quercus suber*). **Tree Physiology**, v. 30, n. 8, p. 946–956, 2010.

VENTURI, V.; KEEL, C. Signaling in the Rhizosphere. **Trends in plant science**, v. 21, n. 3, p. 187–98, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138516000066>>. Acesso em: 17 maio. 2016.

WALKER, T. S.; BAIS, H. P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J. M. Root exudation and rhizosphere biology. **Plant physiology**, v. 132, n. 1, p. 44–51, 1 maio 2003. Disponível em:

<<http://www.plantphysiol.org/content/132/1/44.short>>. Acesso em: 18 abr. 2016.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. In: CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. (Ed.). **Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas**. Chapecó: Argos, 2001. p. 317–334.

XIA, X.-J.; ZHOU, Y.-H.; SHI, K.; ZHOU, J.; FOYER, C. H.; YU, J.-Q. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 10, p. 2839–56, 1 maio 2015. Disponível em: <<http://jxb.oxfordjournals.org/content/66/10/2839.short>>. Acesso em: 30 maio. 2016.

YAMAUCHI, A.; PARDALES JR, J. R.; KONO, Y. Root system structure and its relation to stress tolerance. **Roots and nitrogen in cropping systems of the semi-arid tropics**, p. 211–233, 1994.

YU, N. I.; LEE, S. A.; LEE, M. H.; HEO, J. O.; CHANG, K. S.; LIM, J. Characterization of SHORT-ROOT function in the Arabidopsis root vascular system. **Molecules and Cells**, v. 30, n. 2, p. 113–119, 2010.

ZHONG, R.; YE, Z.-H. Regulation of cell wall biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 10, n. 6, p. 564–72, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950657>>.

ZHOU, Y. H.; YU, J. Q. Allelochemicals and photosynthesis. In: **Allelopathy**. [s.l.] Springer, 2006. p. 127–139.

11. MATERIAL SUPLEMENTAR

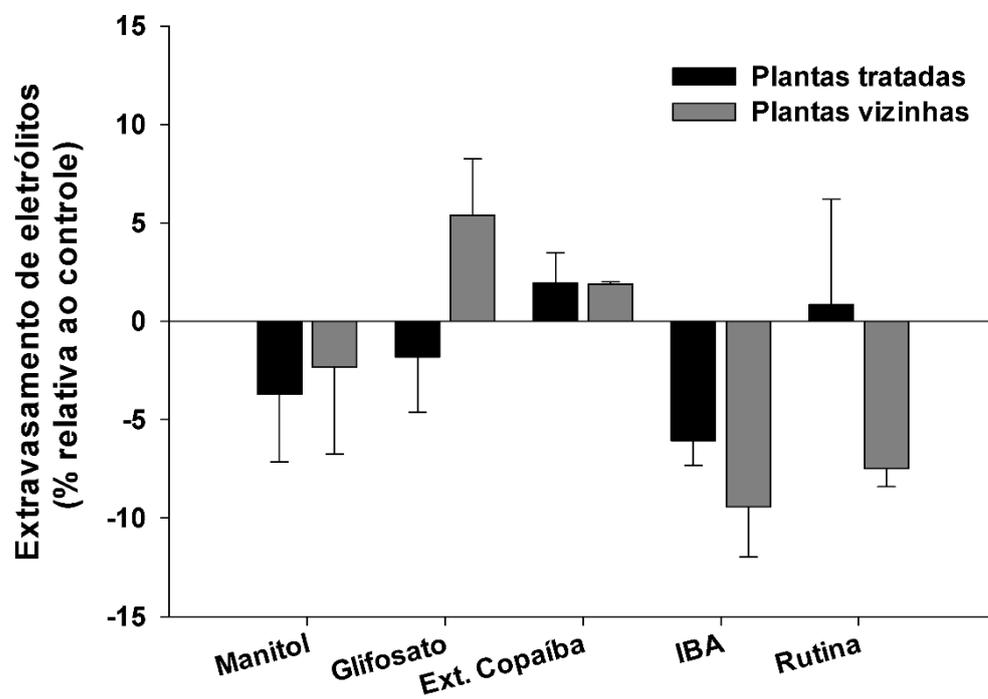


Figura suplementar 1. Integridade e permeabilidade de membranas observadas através da porcentagem de extravasamento de eletrólitos.

Tabela complementar 1. Eficiência do uso da água (*WUE*) em plantas de sorgo após o sétimo dia sob efeito dos diferentes tratamentos aplicados.

<i>Tratamento</i>	<i>WUE</i> [$\mu\text{mol CO}_2$ ($\text{mmol H}_2\text{O}$) ⁻¹]	<i>Diferença relativa ao controle</i>		<i>Diferença relativa a planta vizinha</i>	
		<i>ANOVA</i>	<i>P</i>	<i>ANOVA</i>	<i>P</i>
<i>Controle</i>	21,56 ± 4,51	-	-	-	-
<i>Manitol (Tratamento)</i>	21,99 ± 8,53	ns	0,748	ns	0,748
<i>Manitol (Vizinho)</i>	28,43 ± 13,9	ns	0,748	ns	0,748
<i>Glifosato (Tratamento)</i>	20,28 ± 7,34	ns	0,934	ns	0,934
<i>Glifosato (Vizinho)</i>	19,76 ± 6,88	ns	0,934	ns	0,934
<i>Ext. copaíba (Tratamento)</i>	20,88 ± 8,08	ns	0,980	ns	0,980
<i>Ext. copaíba (Vizinho)</i>	21,00 ± 4,22	ns	0,980	ns	0,980
<i>IBA (Tratamento)</i>	18,02 ± 4,56	ns	0,790	ns	0,790
<i>IBA (Vizinho)</i>	23,55 ± 11,95	ns	0,790	ns	0,790
<i>Rutina (Tratamento)</i>	15,93 ± 3,55	ns	0,878	ns	0,878
<i>Rutina (Vizinho)</i>	20,73 ± 0,28	ns	0,878	ns	0,878

Média ± Desvio padrão. ns não significativo.